

Über die Wirkung des Hydrazins auf spinale Hemmungs-
mechanismen der Katze: eine elektrophysiologische
Untersuchung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ludwig Liebl
aus
Ingolstadt
1 9 7 7

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. D. Ploog

Ober die Wirkung des Hydrazins auf spinale Hemmungs-
mechanismen der Katze: eine elektrophysiologische
Untersuchung



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ludwig Liebl
aus
Ingolstadt
1 9 7 7



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H. D. Lux

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. ten Bruggencate

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 12. 77

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. D. Lux danke ich für die Überlassung des Themas und für viele wertvolle Ratschläge und Hinweise.

Für ihre Unterstützung und für viele fruchtbare Anregungen danke ich den Mitarbeitern der Abteilung Neurophysiologie am Max-Planck-Institut für Psychiatrie. Frau E. Borowietz war mir unermüdlich bei der Literaturbeschaffung behilflich, wofür ich ihr an dieser Stelle danken möchte.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0103

Über die Wirkung des Hydrazins auf spinale Hemmungs- mechanismen der Katze: eine elektrophysiologische Untersuchung

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Hydrazin, Vitamin B ₆ und GABA	3
2	Material und Methoden	7
2.1	Präparation und Versuchsaufbau	93
2.2	Messung, Registrierung und Reizung	12
2.3	Hydrazinapplikation	15
3	Ergebnisse	16
3.1	Elektrocorticogramm (ECoG)	16
3.2	Intrazelluläre Ableitungen	17
3.2.1	Membranpotential (MP), exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) und Aktionspotential (AP)	17
3.2.2	Postsynaptische Hemmung: inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) und inhibitorisches Gleichgewichtspotential (E _{IPSP})	19
3.2.3	Intrazelluläre Cl ⁻ -Injektion	23
3.3	Präsynaptische Hemmung: Hinterwurzelpotential (DRP) und Vorderwurzelreflex (VRR)	26
4	Diskussion	29
4.1	Elektrocorticogramm	29
4.2	Intrazelluläre Ableitungen	29
4.2.1	Postsynaptische Hemmung	31
4.2.2	Quantitative Betrachtung der Cl ⁻ -Injektion	33
4.3	Präsynaptische Hemmung	40
4.4	Wirkungsmechanismus des Hydrazins	43
5	Zusammenfassung	45
6	Literatur	47

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AP	Aktionspotential
DRP	Hinterwurzelpotential (dorsal root potential)
ECoG	Elektrocorticogramm
EEG	Elektroenzephalogramm
E _I PSP	inhibitorisches Umkehr- oder Gleichgewichtspotential
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
FIB	zum M. fibularis longus et brevis gehörig
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (gamma-aminobutyric acid)
GABA-T	GABA-Transaminase (4-aminobutyrat: 2-oxoglutarat aminotransferase, EC 2.6.1.19)
GAD	Glutamatdecarboxylase (L-glutamat 1-carboxy-lyase, EC 4.1.1.15)
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
KG	Körpergewicht
MP	Membranpotential
PAD	primär afferente Depolarisation
PBST	zum posterioren Anteil des M. biceps fem. und zum M. semitendinosus gehörig
Q	zum M. quadriceps fem. gehörig
TIB	zum M. tibialis ant. und zum M. flexor digit. et hall. longus gehörig
VRR	Vorderwurzelreflex (ventral root reflex)
ZNS	Zentralnervensystem

Einleitung und Problemstellung

Unsere Versuche, einem pathophysiologischen Verständnis epileptiformer Krankheitsbilder näherzukommen, sind weitgehend auf tierexperimentelle Studien angewiesen. Die Komplexität der zentralnervösen Steuer- und Regelmechanismen läßt es hierbei wünschenswert erscheinen, grundlegende Erkenntnisse an möglichst einfachen, überschaubaren Modellen zu gewinnen. Die fortgeschrittene Verfeinerung der elektrophysiologischen Techniken hat es möglich gemacht, Wirkungszusammenhänge und pathogenetische Mechanismen auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

Derartige Untersuchungen krankhafter Alterationen der zentralnervösen Regelung bei Tieren können in aller Regel nicht ohne experimentell induzierte "Modell-Epilepsien" auskommen. Es ist zweckmäßig, hierbei Modelle zu wählen, die aufgrund biochemischer, pharmakologischer oder physiologischer Aspekte von humanmedizinischer Bedeutung sind.

Das von uns gewählte Krampfgift Hydrazin ist in dieser Hinsicht aus mehreren Gründen von Interesse:

Als industriell verbreitete und vielfach genutzte Substanz (zur Herstellung von Raketentreibstoffen, als Reduktionsmittel für chemische Grundlagenprozesse etc.; vgl. RÖMPP, 1964; CLARK et al., 1968) hat es eine gewisse sozialmedizinische Bedeutung, die sich in ausführlichen toxikologischen Untersuchungen niedergeschlagen hat (KROP, 1954; BROIHAN, 1957; CLARK et al., 1968).

Derivate des Hydrazins werden therapeutisch genutzt, z.B. das Tuberkulostatikum Isonikotinsäurehydrazid (INH), das bekanntlich auch unerwünschte Wirkungen mit neurologischer Symptomatik aufweist (INH-Krämpfe: BENSON et al., 1952; INH-Neuropathie: GAMMON et al., 1953).

Zu den beschriebenen Wirkungen des Hydrazins gehört auch eine Blockierung Vitamin-B₆-abhängiger Enzymsysteme (ROBERTS et al., 1964), was angesichts der Vitamin-B₆-Stoffwechselstörungen mit neurologischen Auffälligkeiten (z.B. Vitamin-B₆-Mangel, Vitamin-B₆-Abhängigkeit; Übersicht bei TOWER, 1969; WEINER und KLAWANS, 1976) nicht uninteressant erscheint.

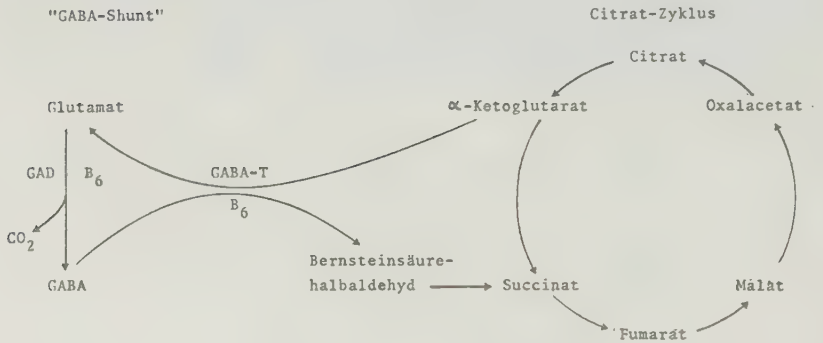
1.1 Hydrazin, Vitamin B₆ und GABA

Die krampferzeugende Wirkung des Hydrazins ist seit langem bekannt (LOEW, 1890); eine Übersicht über die älteren Befunde findet sich bei TRENDELENBURG (1923), der auch die klassischen Symptome der Hydrazinvergiftung (bei Hunden) beschreibt: Erregung, die in Krampfstände übergeht, vermehrte Speichelsekretion, Erbrechen und ausgeprägte Dyspnoe, schließlich Tod im Koma. Diese Befunde wurden später bestätigt und erweitert (FINE et al., 1950; KROP, 1954; WITKIN, 1956; BROIHAN, 1957; O'BRIEN et al., 1964; WEIR et al., 1964).

Während bei den früheren experimentellen Studien die Effekte des Hydrazins auf den Kohlenhydratstoffwechsel im Vordergrund standen (Übersicht bei CLARK et al., 1968), z.B. seine glykogenolytische Wirkung (AMENTA, 1962), rückte später das Bemühen in der Vordergrund, einen Zusammenhang zwischen dem konvulsigen Effekt des Hydrazins und seiner Wechselwirkung mit dem Vitamin-B₆- und GABA-Stoffwechsel herzustellen, da eine zentrale inhibitorische Transmitterfunktion für GABA immer wahrscheinlicher wurde (vgl. ROBERTS et al., 1960).

Als Coenzym Pyridoxal-5'-phosphat ist Vitamin-B₆ an vielen Reaktionen des Aminosäurenstoffwechsels beteiligt, insbesondere an Transaminierungs- und Decarboxylierungsreaktionen (HOLTZ und PALM, 1964; SAUBERLICH, 1968). Die Phosphorylierung von Vitamin B₆ zum aktiven Coenzym wird von dem Enzym Pyridoxal-kinase (ATP:pyridoxal 5'-phosphotransferase, EC 2.7.1.35) katalysiert (McCORMICK et al., 1961).

Für unsere Fragestellung von besonderem Interesse ist die Bedeutung von Pyridoxal-5'-phosphat für den sogenannten "GABA-Shunt" (ROBERTS, 1956). Hierbei besteht für den Abbau von α -Ketoglutarat zu Succinat im Rahmen des Citronensäurezyklus ein Nebenschluß, der nach Decarboxylierung von Glutamat zu GABA über eine Transaminierung mit α -Ketoglutarat zu Bernsteinsäurehalbaldehyd und schließlich zu Succinat führt (TOWER, 1960; BAXTER und ROBERTS, 1960).



Neben der Synthese des hemmenden Transmitters GABA wird diesem GABA-Shunt noch ein gewisser Anteil (10 - 40%) an der Energiebereitstellung für die cerebralen Stoffwechselprozesse zugeschrieben (McKHANN et al., 1960; MACHIYAMA et al., 1965).

Zwei Schlüsselenzyme dieses Abbauweges sind Vitamin-B₆-abhängig (TOWER, 1956, 1960; HOLTZ und PALM, 1964), nämlich die Glutamatdecarboxylase (GAD; L-glutamat 1-carboxy-lyase, EC 4.1.1.15) (ROBERTS und FRANKEL, 1951) und die GABA-Transaminase (GABA-T; 4-aminobutyrat:2-oxoglutarat aminotransferase, EC 2.6.1.19) (BESSMAN et al., 1953; ROBERTS und BREGOFF, 1953).

Als typisches "Carbonyl-Reagens" reagiert Hydrazin unter Hydrazonbildung mit Carbonylsauerstoff und kann dadurch die funktionell wichtige Aldehydgruppe des Pyridoxal-5'-phosphats blockieren. Die aufgrund dieser Tatsache zu erwartende Enzymhemmung ist dann auch in vivo (Mäuse und Rattenhirn) und in vitro gemessen worden: Hydrazin blockiert in konvulsigen Dosen die GAD (McCORMICK et al., 1960; MEDINA, 1963; ROBERTS et al., 1964; WOOD und PEESKER, 1974, 1975; WU und ROBERTS, 1974; WU, 1976) und die GABA-T (MEDINA, 1963; WU, 1976). Hierbei wird die GABA-T, wohl aufgrund ihrer größeren Affinität zum Coenzym (BAXTER und ROBERTS, 1960), etwas stärker gehemmt als die GAD (BAXTER und ROBERTS, 1958; MEDINA, 1963).

Als zusätzlicher Effekt wurde noch eine erhebliche Inhibition der Pyridoxalkinase in vivo und in vitro nachgewiesen (McCORMICK et al., 1960; McCORMICK und SNELL, 1961).

Hydrazin entfaltet in diesem Zusammenhang also eine doppelte Wirkung: durch die Hemmung der Pyridoxalkinase vermindert es die Bildung von aktivem Coenzym und inaktiviert durch die Hydrazonbildung noch zusätzlich bereits gebildetes Pyridoxal-5'-phosphat.

Als Gesamteffekt dieser komplexen biochemischen Wirkungen wurde (an Mäuse- und Rattenhirnen) übereinstimmend eine Erhöhung der cerebralen GABA-Spiegel unter Hydrazin in krampferzeugenden Dosen beobachtet (MAYNERT und KAJI, 1962; MEDINA, 1963; UCHIDA und O'BRIEN, 1964; WOOD und PEESKER, 1974, 1975), ein für ein Krampfgift eher paradoxer Befund. Dies führte dazu, Spekulationen über einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen cerebralen GABA-Spiegeln und konvulsiven Zuständen als unhaltbar aufzugeben (BALZER et al., 1960; MAYNERT und KAJI, 1962; MEDINA, 1963; BAXTER, 1970; WOOD und PEESKER, 1974; ROBERTS und HAMMER-SCHLAG, 1976).

Angeichts der bekannten Kompartimentierung des Glutamat-GABA-Systems im zellulären und subzellulären Bereich (LAJTHA et al., 1960; BAXTER, 1970; PATEL et al., 1974; BAXTER, 1976) erscheint eine vergleichsweise grobe Methode wie die Bestimmung von GABA-Spiegeln in Homogenaten von Gehirnen oder Gehirnregionen allerdings als inadäquat. Auch die Versuche, konvulsive und subkonvulsive Zustände durch die Betrachtung des GABA-Turnovers biochemisch zu differenzieren (WOOD und PEESKER, 1974, 1975; TAPIA et al., 1975), erbrachten bisher keine befriedigenden Resultate.

Obwohl also mannigfache Belege für die Wechselwirkung von Vitamin-B₆-Inhibitoren (wie Hydrazin) mit dem GABA-Metabolismus vorliegen, ist es bis jetzt nicht gelungen, ein eindeutiges biochemisches Korrelat ihrer krampferzeugenden Wirkung nachzuweisen (BAXTER, 1976).

Der bisher noch nicht unternommene Versuch, den konvulsigen Effekt des Hydrazins mit elektrophysiologischen Methoden zu untersuchen, erschien deshalb gerechtfertigt.

Elektrophysiologische Befunde über die Effekte einer krampferzeugenden Substanz lassen sich schon mit vergleichsweise geringem meßtechnischem Aufwand erheben, z.B. durch Ableitung neuronaler Summenpotentiale wie etwa beim EEG. Will man jedoch näheren Aufschluß über die der beobachteten Krampfaktivität zugrundeliegenden Wirkungsmechanismen erlangen, ist es unerläßlich, die Veränderungen der zentralnervösen Aktivitätsmuster auf der Ebene der kleinsten funktionellen Einheit, des Einzelneurons, zu untersuchen.

Mit Vorteil läßt sich dies am spinalen Motoneuron der Katze durchführen; Das Präparat gestattet langdauernde intrazelluläre Registrierungen, sodaß in der Regel sowohl Eintritt als auch Abklingen einer Drogenwirkung beobachtet werden können. In Bezug auf die Übertragbarkeit der hier erhobenen Befunde auf die interessierende humane Pathophysiologie hat es den Vorteil, phylogenetisch nicht allzu entlegen zu sein.

Eine krankhaft vermehrte zentralnervöse Aktivität, wie sie im Krampfgeschehen zum Ausdruck kommt, läßt sich bei Betrachtung des motorischen Einzelneurons durch drei grundlegende Mechanismen erklären, die isoliert oder in Kombination auftreten können:

1. Vermehrung des erregenden Zustroms
2. Verminderung des hemmenden Zustroms
3. Änderungen der neuronalen Eigenschaften im Sinne einer vermehrten Erregbarkeit oder einer verminderten Hemmbarkeit

Um Anhaltspunkte über den genaueren Mechanismus der krampferzeugenden Wirkung des Hydrazins zu erhalten, registrierten wir deshalb folgende Parameter neuronaler Aktivität:

das Elektrocorticogramm (ECoG), um Rückschlüsse auf den Zeitverlauf und die Generalisationstendenz der Drogenwirkung ziehen zu können,

die intrazellulären Potentiale und Potentialänderungen der ortho- und antidrom erregten Motoneurone zur Beobachtung eines spezifischen Effekts auf die neuronale Erregbarkeit und den Mechanismus der postsynaptischen Exzitation bzw. Inhibition,

das Hinterwurzelpotential (DRP) und den konditionierten Vorderwurzelreflex (VRR), um eine Beeinflussung der präsynaptischen Hemmung zu untersuchen.

2.1 Präparation und Versuchsaufbau

38 Katzen mit einem Körpergewicht von 1.9 bis 3.4 kg Körpergewicht (KG) wurden nach Prämedikation mit 0.2 mg Atropin mit einer intraperitonealen Initialdosis von 35 mg/kg KG Pentobarbital (Nembutal^R) narkotisiert. Ein Polyäthylenkatheter wurde von der linken V. radialis aus in die V. subclavia vorgeschoben; durch kontinuierliche Zufuhr kleinster Mengen physiologischer Kochsalzlösung mit einer Infusionspumpe wurde dieser intravenöse Zugang offengehalten.

Anschließend wurde eine Tracheotomie mit Kanülierung der Trachea zur künstlichen Beatmung durchgeführt. Dann erfolgte eine beidseitige Ligatur der Aa. carotis comm. zur partiellen ischämischen Decortication in allen Fällen, in denen kein ECoG abgeleitet wurde. Zur kontinuierlichen blutigen Blutdruckmessung führten wir einen Katheter in die rechte A. femoralis ein, an den ein Druckaufnehmer angeschlossen war.

Auf der linken Seite wurden für die orthodrome periphere Reizung von den unten angeführten Hinterbeinnerven diejenigen Äste freipräpariert und auf plastikisolierte Silberdrahtreizelektroden gelegt, die die jeweils danebenstehenden Muskeln versorgen:

N. femoralis	M. quadriceps fem. (Q)
N. ischiadicus	M. biceps fem. (posteriorer Anteil), M. semitendinosus (PBST)
N. tibialis	M. gastrocnemius, M. soleus (GS), M. tib. ant., M. flexor digit. et hall. longus (TIB)
N. fibularis	M. fib. longus et brevis (FIB)

Nach einer zwischen L_3 und S_2 durchgeführten Laminektomie wurde der Durasack eröffnet, das lumbosakrale Rückenmark freigelegt und mit temperiertem Paraffinöl (38 °C) bedeckt. Zur segmentalen antidromen Reizung wurde eine Silberdrahtreizelektrode unter eine intakt gelassene Vorderwurzel, in der Regel L_6 oder L_7 , geschoben. Zur Registrierung des Hinterwurzelpotentials (DRP) wurde das kaudalste Hinterwurzelfilament von L_6 freipräpariert, abgeschnitten und auf eine bipolare Silberdrahtableitelektrode gelegt (Elektrodenabstand 1 bis 1,5 cm). Der afferente Zustrom wurde an der Eintrittsstelle der Hinterwurzel (L_6 oder L_7) mit einer Silberballelektrode abgeleitet. Die intrazellulären Ableitungen erfolgten in den Segmenten L_5 bis S_1 , in den Kerngebieten des PBST, GS, TIB und FIB (ROMANES, 1951; BALTHASAR, 1952).

Hierzu wurden die Mikroelektroden nach vorsichtiger Spreizung der Hinterwurzeln und Abpräparieren der Pia von der Rückenmarksoberfläche (um mechanische Ableitartefakte durch Gewebzug beim Vorschub der Mikroelektroden möglichst klein zu halten) mit einem Mikrotrieb in die Kerngebiete gebracht.

Zur Ausschaltung supraspinaler Einflüsse auf die moto-neuronalen Potentiale wurden die Tiere in Höhe von L_1 spinalisiert (TEN BRUGGENCATE et al., 1974).

Bei 9 Tieren wurde durch ein linksseitiges fronto-parietales Bohrloch eine Silberballelektrode auf die intakte Dura aufgesetzt und ein ECoG gegen eine indifferentere Elektrode in der Nackenmuskulatur abgeleitet.

Nach der Präparation wurden die Tiere mit Gallamin (Flaxedil^R) relaxiert und mit einer Mischung von 30% Sauerstoff und 70% Lachgas künstlich beatmet. Da hierdurch keine Anaesthetie gewährleistet ist (RUSSEL, 1973; RICHARDS und WEBB, 1975), wurde noch 0.4 Vol% Fluothan (Halothan^R) zugesetzt.

Zur weitgehenden Ausschaltung atmungsbedingter Ableitartefakte wurde ein beidseitiger Pneumothorax angelegt. Die Einstellung von Frequenz und Zugvolumen der künstlichen Respiration erfolgte nach Maßgabe der expiratorischen CO₂-Konzentration, die mit einem Medical Gas Analyzer (Fa. Beckman) fortlaufend überwacht und auf Werten zwischen 3.0 und 4.5 Vol% gehalten wurde.

Die Blutdruckmessung erfolgte mit einem Widerstandsbrücken-Druckaufnehmer (Fa. Bell & Howell). Durch Variation von Menge und Zufuhrgeschwindigkeit der infundierten physiologischen Kochsalzlösung konnten in der Regel physiologische Blutdruckwerte aufrechterhalten werden; längeres Absinken des systolischen Blutdrucks unter 90 mm Hg veranlasste den Abbruch des Experiments.

Die rektale Temperatur der Tiere wurde kontinuierlich gemessen und, ebenso wie die Temperatur des Paraffinölbades, das das Rückenmark bedeckte, durch ein rückkopplungsgesteuertes Heizkissen und eine Rotlichtlampe konstant zwischen 37.5 und 38.5 °C gehalten.

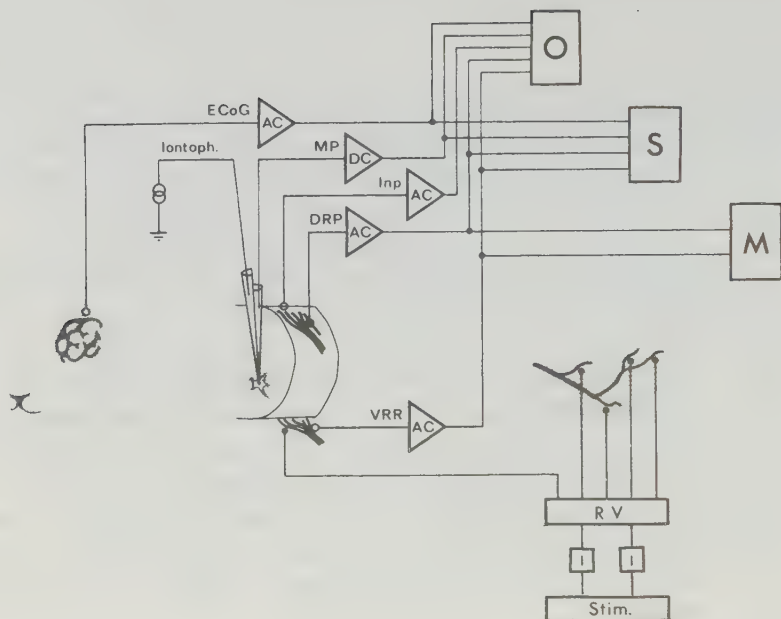


Abb. 1: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung

Die an den angedeuteten Stellen abgeleiteten biologischen Signale werden gleichstrom- (DC) oder wechselstrommäßig (AC) verstärkt, auf einem Oszilloskop (O) dargestellt, mit einem UV-Registrieroszillographen (S) fortlaufend aufgezeichnet, und zur Mittelwertbildung einem Digitalrechner (M) zugeführt.

ECoG = Elektrocorticogramm; Iontoph. = Iontophoreseeinheit (Konstantstromquelle zur intrazellulären Applikation von Ionen); MP = Membranpotential (des penetrierten Motoneurons); Inp. = Input (an der Eintrittsstelle der Hinterwurzel als Reizfolge registriertes Summenaktionspotential); DRP = Hinterwurzelpotential (dorsal root potential); VRR = Vorderwurzelreflex (ventral root reflex).

Die ortho- und antidrome Reizung erfolgt mit einem Reizpulsgenerator (Stim.) über Reizisolierungseinheiten (I) und einen Reizverteiler (RV).

2.2 Messung, Registrierung und Reizung

Eine schematische Darstellung der Versuchsanordnung ist der Abb. 1 zu entnehmen.

Zur intrazellulären Potentialmessung benutzten wir mit einem herkömmlichen Elektrodenziehgerät hergestellte Trennwandmikropipetten, die auf beiden Seiten mit einer Mischung aus 1.5 M Kaliumzitrat- und 1.5 M KCl-Lösung im Verhältnis von 9 : 1 gefüllt wurden (LUX et al., 1970). Ein geringer Zusatz von KCl verbessert die elektrischen Eigenschaften der Elektroden. Er reduziert die Gleichrichtung und Polarisierung bei Strompassage, ohne die chloridabhängige postsynaptische Hemmung merklich zu beeinflussen. Durch vorsichtiges Anstoßen an einen Glasstab wurden die Elektroden unter dem Mikroskop auf Spitzendurchmesser zwischen 1.5 und 2.5 μm angebrochen, wodurch sich Elektrodenwiderstände zwischen 5 und 15 MOhm ergaben.

Die intrazellulär gemessenen Signale wurden mit einem in den Elektrodenhalter integrierten FET-Vorverstärker mit hoher Eingangsimpedanz ($10^{12}\Omega$) gleichstrommäßig 10-fach vorverstärkt (siehe Abb. 2). Die trotz des kurzen Eingangsweges durch Streukapazitäten am Eingang auftretenden kapazitiven Verluste, die die Frequenzantwort beeinträchtigten, wurden mit einer Kapazitäts-Neutralisation (CN), bei der ein Teil des vorverstärkten Signals über einen Kondensator auf den nichtinvertierenden Verstärkereingang rückgekoppelt wird, weitgehend ausgeglichen.

Während der Messung wurde der Elektrodenwiderstand fortlaufend mit einem kurzen Testpuls (P_2) nach der Voltage-Ramp-Methode von LETTVIN et al. (1958) überwacht. Hierbei wurde die Pulsdauer mit 0.8 msec kurz gegenüber der Membranzeitkonstanten gewählt, um Umladungen der Zellmembran auszuschließen.

Die intrazelluläre Strominjektion zur Ermittlung des Membranwiderstands, der Erregungsschwelle und des inhibitorischen Gleichgewichtspotentials erfolgte über einen 1-GOhm-Widerstand, der in Serie mit dem Ausgang eines Rechteckpulsgenerators geschaltet war, um eine Konstantstromquelle anzunähern. Als Maß des hierbei fließenden Stroms wurde der Spannungsabfall über diesem Widerstand gemessen. Für Elektrodenwiderstände bis 15 MOhm sind hierbei Abweichungen des tatsächlich fließenden vom gemessenen Strom in der Größenordnung bis 1.5% zu erwarten.

Zur Kompensation des Spannungsabfalls über der Elektroden spitze, der durch die Strompassage erzeugt wird und im gemessenen Signal additiv zum Spannungsabfall über der Membran hinzutritt, diente eine Brückenschaltung, ähnlich der von FRANK und FUORTES (1956) beschrieben, bei der ein wählbarer, im Idealfall dem Spannungsabfall über dem Elektrodenwiderstand entsprechender Anteil des Pulses P_1 über den invertierenden Eingang des darstellenden Oszilloskops vom registrierten Signal abgezogen wird. Dabei bildet der Elektrodenwiderstand in Serie mit dem 1-GOhm-Widerstand den einen Ast der Brücke, die beiden Anteile des Brückenwiderstands (Br) den anderen.

Während der Brückenabgleich im Extrazellulärbereich problemlos ist - bei Strompassage durch die Mikroelektrode darf kein Spannungsabfall gemessen werden -,

bietet er nach der Penetration eines Neurons oft gewisse Schwierigkeiten, da der Elektrodenwiderstand sich hierbei häufig ändert. Wir nahmen den Abgleich dann anhand der unterschiedlichen Zeitkonstanten des Spannungsanstiegs über dem Elektroden- und dem Membranwiderstand und nach der Voltage-Height-Methode von FRANK und FUORTES (1956] vor.

Als Bezugspunkt für die Spannungsmessung diente eine großflächige Ag-AgCl-Elektrode, die in die Rückenmuskulatur des Tieres eingenäht wurde.

Zur intrazellulären Iontophorese von Cl^- -Ionen kamen ebenfalls Trennwandkapillaren zur Verwendung. Ein Kanal war wie oben beschrieben gefüllt und diente als Ableitelektrode, der andere Kanal enthielt 0,5 M KCl-Lösung und war mit einer batteriebetriebenen, von Masse isolierten Konstantstromquelle (LUX et al., 1970) verbunden.

Die extrazellulären Signale wurden wechselstrommäßig mit Silberdrahtelektroden abgeleitet.

Zur Darstellung und Registrierung benutzten wir ein Zweistrahloszilloskop (Tektronix RM 565) mit einer Spezialkamera (Nihon Kohden PC-2A). Langsame Potentialänderungen wurden mit einem UV-Direktschreiber (Schlumberger OM 4501) fortlaufend aufgezeichnet. DRP und VRR wurden mit einem Digitalrechner (DIDAC 800) gemittelt.

Zur Reizung wurde ein Reizpulsgenerator der Fa. Tönnies (Typ D) benutzt, wobei die Pulse zur Vermeidung größerer Artefakte von Masse isoliert wurden; die zu reizenden Afferenzen konnten über einen Reizverteiler ausgewählt werden.

Jeder Reiz- und Meßzyklus dauerte eine Sekunde und wurde von einem Taktgeber angestoßen, der das Oszilloskop, das Reizgerät, den DIDAC und, mit definierten Verzögerungen, die Pulsgeneratoren P_1 und P_2 ansteuerte.

2.3 Hydrazin-Applikation

Entsprechend den Angaben von O'BRIEN et al. (1964) wurde das stark alkalische Hydrazinhydroxid mit HCl neutralisiert ($\text{pH } 7.4 \pm 0.1$) und mit 0.9% NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 1.0 bzw. 1.5 mM/ml verdünnt (Konzentration der freien Base angegeben).

Als günstigste Infusionsgeschwindigkeit für die systemische Applikation erwies sich 1 ml/min. Bei größeren Infusionsgeschwindigkeiten traten starke, hauptsächlich durch Blutdruckschwankungen (WEIR et al., 1964) zu erklärende Meßartefakte auf, die oft genug zum Verlust des Neurons führten.

Aufgrund der großen Toxizität des Hydrazins konnte nur eine Hydrazingabe pro Experiment durchgeführt werden, die Tiere starben nach 1 bis 4 Stunden.

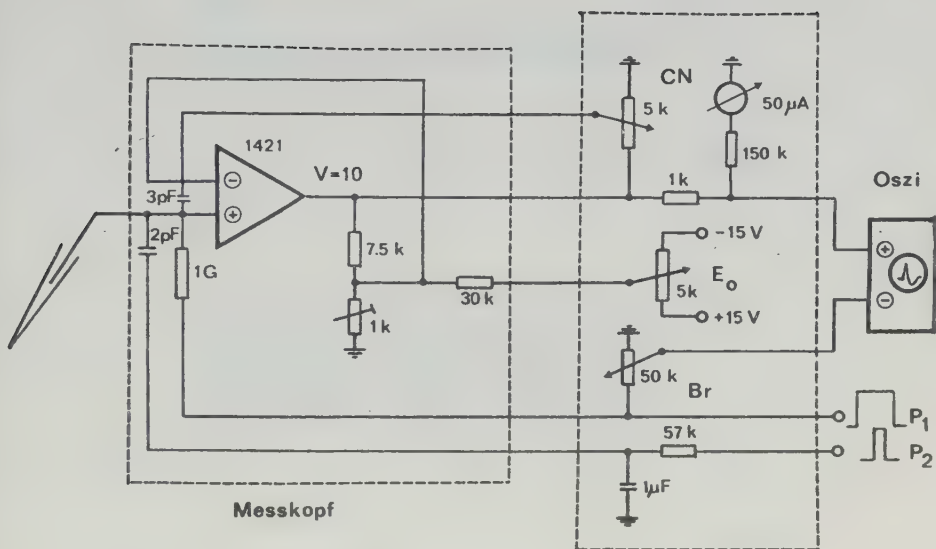


Abb. 2; Schaltbild des Vorverstärkers mit dem in den Elektrodenhalter integrierten Meßkopf

CN	Kapazitätsneutralisierung
E_o	Spannungsabgleich des Verstärker- ausgangs
Br	Brückenabgleich
P_1	Rechteckpulsgenerator zur intrazellu- lären Strominjektion
P_2	Rechteckpulsgenerator zur Messung des Elektrodenwiderstandes
1421	Operationsverstärker Teledyne-Phil- brick 1421 zur zehnfachen Vorverstär- kung des Eingangssignals
Oszi.	Oszilloskop

3 Ergebnisse

3.1 Elektrocorticogramm (ECoG)

Abb. 3 zeigt die Wirkung von Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.) auf das ECoG der narkotisierten Katze.

Die erste Krampfaktivität war nach 24 ± 6 min ($n = 9$) zu registrieren und hielt eine Stunde und länger an. Etwa 30 min vor dem Tod des Tieres, der im Mittel nach zwei Stunden eintrat, war ein Übergang in niederfrequente Aktivität geringer Amplitude und schließlich Null-Linien-EEG zu beobachten.

Das iktale EEG war von klonischer Aktivität von hoher Amplitude (über 500 μ V) im Frequenzbereich zwischen 5 und 10 Hz gekennzeichnet (s. Abb. 3 B). Diese Perioden klonischer Wellen, die etwa 30 sec bis 2 min dauerten, standen in rhythmischem Wechsel mit Phasen tonischer paroxysmaler Aktivität von kleinerer Amplitude (bis 200 μ V) und höherer Frequenz (10 bis 15 Hz), die ebenfalls bis zu 2 min anhalten konnten. Diese Periodizität des ikталen Geschehens ist gut aus Abb. 3 C zu ersehen.

Intermittierend erholte sich das EEG zu annähernd normaler Aktivität (wie in Abb. 3 A); diese interiktalen Pausen dauerten bis zu 5 min.

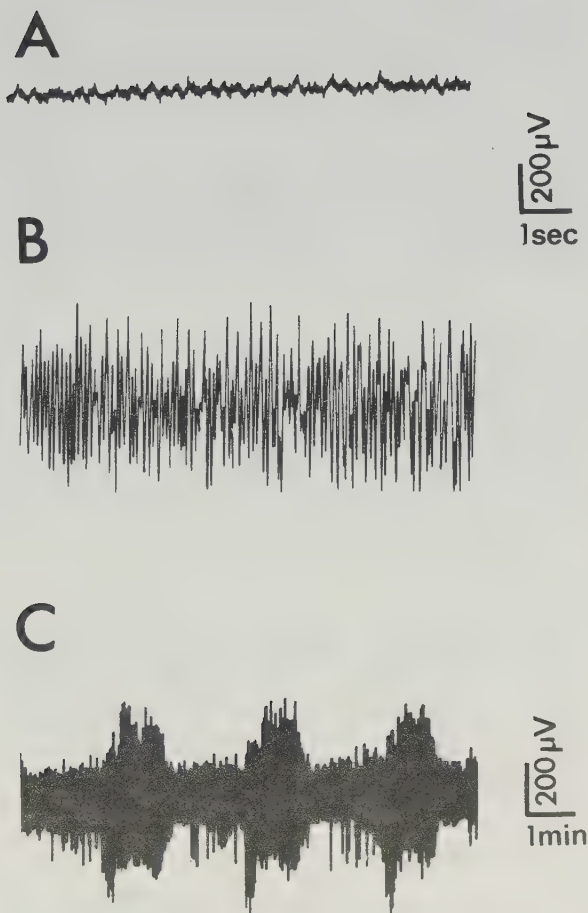


Abb. 3: Frontoparietales Elektrocorticogramm (ECoG) der Katze vor (A) und 25 min. (B,C) nach Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.). C wurde mit langsamerer Zeitauflösung geschrieben. Narkose: 0.4 Vol% Halothan^R, N₂O und O₂ (7 : 3).

3.2 Intrazelluläre Ableitungen

3.2.1 Membranpotential (MP), exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) und Aktionspotential (AP)

Im Dosisbereich von 1.0 bis 1.5 mM Hydrazin pro kg Körpergewicht kam es bei den untersuchten Motoneuronen zu keinen länger dauernden oder irreversiblen Membranpotentialänderungen, sofern eine Infusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min nicht überschritten wurde.

Während und nach der Hydrazin-Infusion traten Membranpotentialschwankungen von ± 3 mV auf, dann jedoch stabilisierte sich das MP und blieb für den Rest der Beobachtungszeit weitgehend konstant (s. Abb. 7), in der Regel auf einem leicht depolarisierten Niveau (Mittelwert des MP vor Hydrazin -68 mV; 30 min nach Hydrazin -66.5 mV; n = 22).

Nach zu schneller Infusion wurden stärkere Fluktuationen des MP beobachtet, die meist von einer zunehmenden Depolarisation des Neurons gefolgt waren. Diese Zellen wurden nicht mit in die Auswertung mit einbezogen. Derartige Veränderungen lassen sich auf mechanische Artefakte durch Pulsationen aufgrund von Blutdruckschwankungen (WEIR et al., 1964) und auf ischämische Alterationen der lokalen Zirkulation zurückzuführen.

Die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP) wurden durch Hydrazin weder in Amplitude noch Anstiegssteilheit oder Gipfellatenz auffällig verändert. Es traten auch keine vermehrten Spontanentladungen oder Spontan-EPSPs auf.

Amplitude, Überschußpotential und Nachhyperpolarisation der ortho- und antidrom ausgelösten Aktionspotentiale (AP) blieben nach Hydrazin, von geringfügigen Schwankungen während der ersten 5 bis 10 min nach der Infusion abgesehen (s. Abb. 7), ebenso unverändert wie der Schwellenwert für die Auslösung des AP (Abb. 6, 7 und 10).

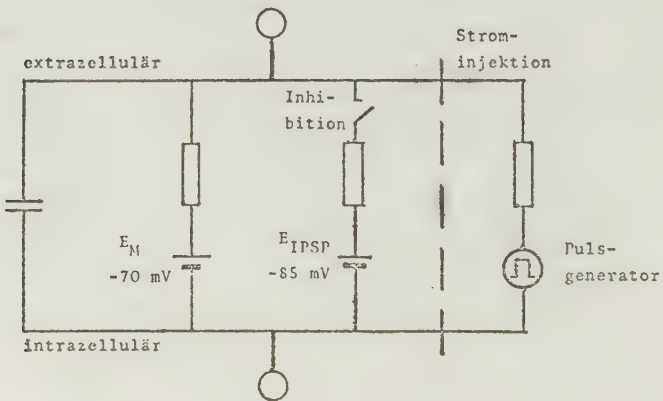
War ein antidrom ausgelöstes AP von einer rekurrenten oder Renshaw-Hemmung gefolgt, so zeigte sich unter Hydrazin die gleiche disinhibierende Wirkung (Abb. 6) wie bei der orthodromen postsynaptischen Hemmung (s. u.).

Bei längeren Beobachtungszeiten (mehr als 60 min) trat bei der Hälfte der untersuchten Motoneuronen eine irreversible Depolarisation ein, meist gefolgt vom Tod des Tieres. Dieser Depolarisation ging in der Regel ein Nachlassen der synaptischen Übertragung voraus, wobei die Exzitation ebenso stark betroffen war wie die Inhibition. Die antidrome Erregbarkeit blieb jedoch bei unveränderter Schwelle zunächst erhalten (s. Abb. 11) und ging erst mit zunehmender Depolarisation verloren.

3.2.2 Postsynaptische Hemmung: inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) und inhibitorisches Gleichgewichtspotential (E_{IPSP})

Abb. 4 gibt einen schematischen Überblick über die reziproke Innervation auf spinaler Ebene und ein einfaches Beispiel für das funktionelle Zustandekommen von EPSP und IPSP (Muskeldehnungsreflex).

Die durch den inhibitorischen Reiz ausgelöste Transmitterausschüttung bewirkt eine kurzzeitige Leitfähigkeitsänderung der subsynaptischen Membran (Schließen des Schalters "Inhibition" im unten stehenden Ersatzschaltbild). Das Membranpotential, das vorher gleich E_M war, wird nun vorübergehend vom Potential der inhibitorischen Batterie E_{IPSP} mitbestimmt und in Richtung auf E_{IPSP} hin verlagert.



E_{IPSP} ist normalerweise negativer als das Ruhemembranpotential E_M , sodaß diese Membranpotentialänderung, das IPSP, hyperpolarisierend ist (BROCK et al., 1952; COOMBS et al., 1955). Dadurch wird die Erreichung der Entladungsschwelle durch depolarisierende, exzitatorische Potentiale (EPSP) erschwert oder verhindert, das Neuron wird gehemmt.

Wenn man im Experiment das Membranpotential der Zelle durch Strominjektion ändert, kann man direkt E_{IPSP} bestimmen als das Potential, bei dem die inhibitorische Leitfähigkeitserhöhung keine Membranpotentialänderung bewirkt, d.h. die Amplitude des IPSP gleich Null ist. Ist das "künstliche" Membranpotential negativer als das E_{IPSP} , so bedeutet die kurzzeitige Potentialauslenkung demgemäß ein depolarisierendes IPSP (s. Abb. 5 und 11).

Hydrazin in einer Dosierung von 1.0 bis 1.5 mM/kg KG zeigte in allen untersuchten Fällen eine deutliche, teilweise reversible Wirkung auf die postsynaptische Hemmung. Es reduzierte die Amplitude des IPSP und verlagerte das Umkehrpotential des IPSP (E_{IPSP}) in Richtung auf das Membranruhepotential (Abb. 5 bis 8, 10, 11).

Die maximale Depolarisation des E_{IPSP} war im Mittel nach 22 min zu beobachten (Extremwerte 14 und 35 min).

Weder das Ausmaß der E_{IPSP} -Verschiebung noch ihr Zeitgang ließen eine Beziehung zur verwendeten Hydrazindosis (1.0 mM: 7 Motoneurone; 1.5 mM: 15 Motoneurone) erkennen.

In 17 von 22 untersuchten Fällen bildeten sich die unter Hydrazin beobachteten Veränderungen innerhalb von etwa 60 min ganz oder teilweise zurück (Abb. 8).

E_{IPSP} betrug vor Hydrazin -83.5 ± 5.5 mV ($m \pm S.D.$; $n = 17$) und 22 min nach Hydrazin -70.5 ± 2.5 mV. Dies entspricht einer Reduktion der treibenden Kraft der inhibitorischen Batterie um 74% (s. Abb. 8). Diese Wirkung, die zeitlich gut mit dem Einsetzen der Krampfaktivität im ECoG korrelierte, ist in den Abb. 5, 6 und 11 anhand polysynaptischer IPSPs illustriert, bei denen sie aufgrund einer immerhin möglichen EPSP-Beimischung etwas schwerer zu beurteilen ist; sie war jedoch in gleicher Weise auch bei direkten und Renshaw-IPSPs zu beobachten.

Das E_{IPSP} wurde hierbei, wie in Abb. 5, 11 und 12 dargestellt, durch Polarisierung der Membran mittels rechteckförmiger Stromimpulse bestimmt.

Stellt man die Beziehung zwischen dem jeweiligen MP und der Amplitude und Polarität des IPSP graphisch dar (Abb. 10), kann man anhand der Steigung der erhaltenen Geraden eine Abschätzung der "synaptischen Effektivität" vornehmen, d. h. der Relation zwischen einem konstanten inhibitorischen Reiz und der von ihm bewirkten Leitfähigkeitsänderung.

Nimmt die Steilheit der Geraden unter der Drogenwirkung ab, so ist ein präsynaptischer Angriffspunkt, etwa eine Verminderung der Transmitterausschüttung bzw. Transmitterwirkung anzunehmen, wie z.B. unter Strychnin (LARSON, 1969).

Unter Hydrazin zeigte sich typischerweise (17 von 22 Motoneuronen) keine Veränderung in der Steilheit der Beziehung zwischen IPSP-Amplitude und MP (Abb. 10).

Die passiven Membraneigenschaften, wie die Zeitkonstante τ_M und der neuronale Eingangswiderstand R_N (s. Abb. 9) zeigten keine signifikante Veränderung.

R_N wurde hierbei aus der Steigung der Strom-Spannungskennlinie des Neurons ermittelt, die die Beziehung zwischen Größe und Polarität des in die Zelle injizierten Stroms und dem dadurch über der Membran bewirkten Spannungsabfall wiedergibt.

Wie oben schon ausgeführt, trat bei der Hälfte der beobachteten Motoneurone als Spätwirkung in der Zeit zwischen 60 und 80 min nach der Hydrazininfusion eine zunehmende Depolarisation auf. Ein Nachlassen der synaptischen Wirksamkeit ging dieser Depolarisation voraus oder begleitete sie (Abb. 11).

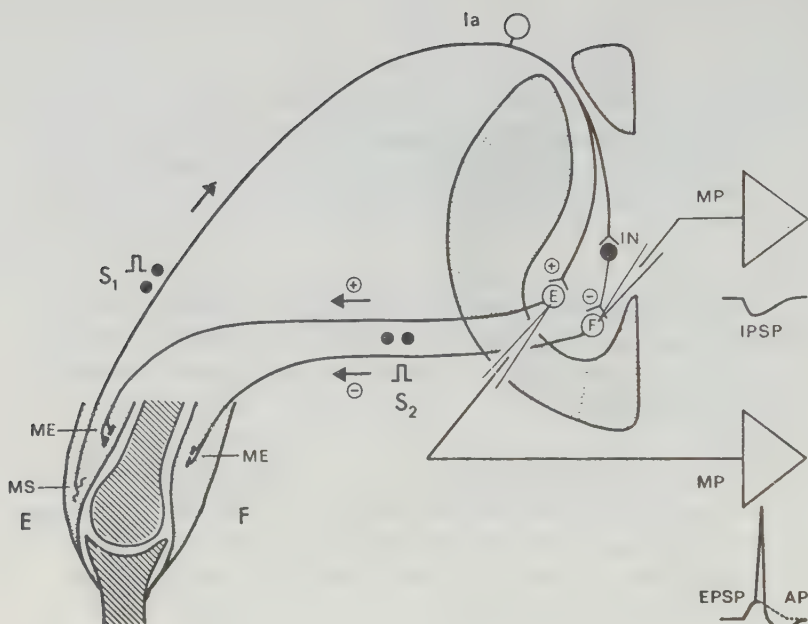


Abb. 4: Schematische Darstellung des einfachen spinalen Reflexbogens (nur Ia-Afferenzen gezeichnet).

Wird die von der Muskelspindel (MS) eines Extensormuskels (E) kommende Ia-Afferenz gereizt (S₁), so wird das zugehörige Extensormotoneuron (E) erregt (+), während das antagonistische Flexormotoneuron (F) nach Zwischenschaltung eines Interneurons (IN) gehemmt wird (-). Im Extensormotoneuron registriert man bei intrazellulärer Ableitung ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP), das bei Überschreitung des Schwellenpotentials ein Aktionspotential (AP) hervorruft. Im Flexormotoneuron wird ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) ausgelöst. S₂ verdeutlicht die antidrome Reizung an der Vorderwurzel, die in beiden Motoneuronen eine Erregung bewirkt.

ME = motorische Endplatte

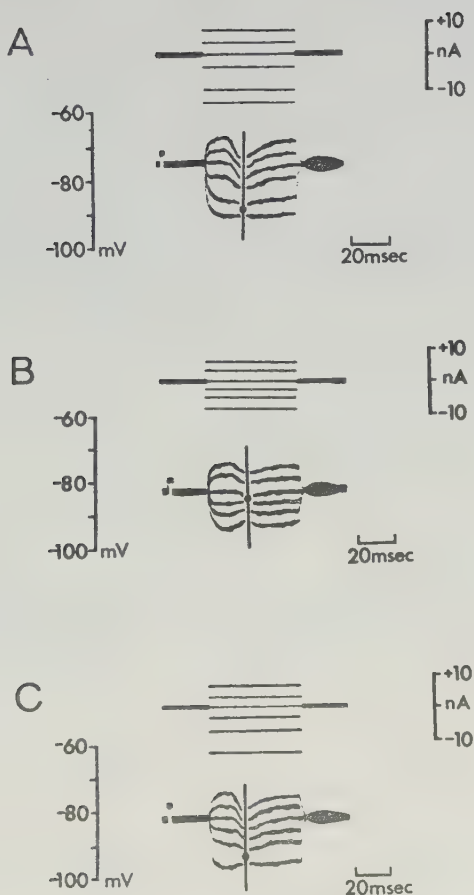


Abb. 5: Membranpotential, IPSP und inhibitorisches Gleichgewichtspotential (E_{IPSP}) eines Quadriceps-Motoneurons (A) vor, (B) 25 min. und (C) 40 min. nach Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.).

Die obere Spur zeigt jeweils Größe und Dauer der injizierten rechteckförmigen Stromimpulse, die untere Spur die entsprechenden Membranpotentialänderungen. Der Punkt bezeichnet das jeweilige E_{IPSP} .

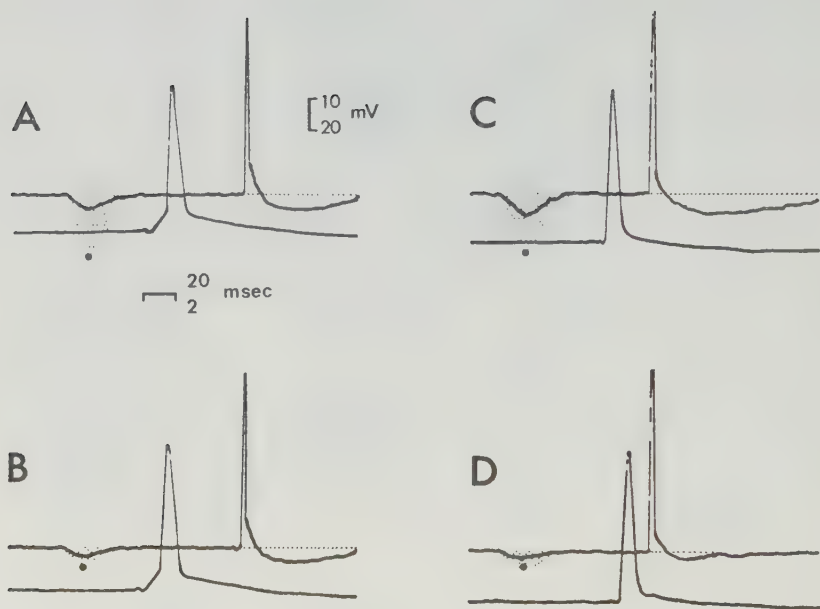


Abb. 6: Membranpotential, Aktionspotential (AP), ortho- und antidrome Hemmung zweier PBST-Motoneurone.

A und C jeweils vor, B und D 24 bzw. 28 min. nach Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.). E_{IPSP} ist durch Punkte markiert.

In A und B ist das orthodrom ausgelöste AP von einer durch Hydrazin nicht beeinflussten Nachhyperpolarisation gefolgt.

In C und D folgt auf das antidrom ausgelöste AP eine langdauernde rekurrente Hemmung, die ebenso wie das vorausgehende durch periphere Reizung ausgelöste IPSP durch Hydrazin vermindert wird.

Die Membranpotentiale betrugen -65 mV (A),
- 63 mV (B) und -70 mV (C und D).

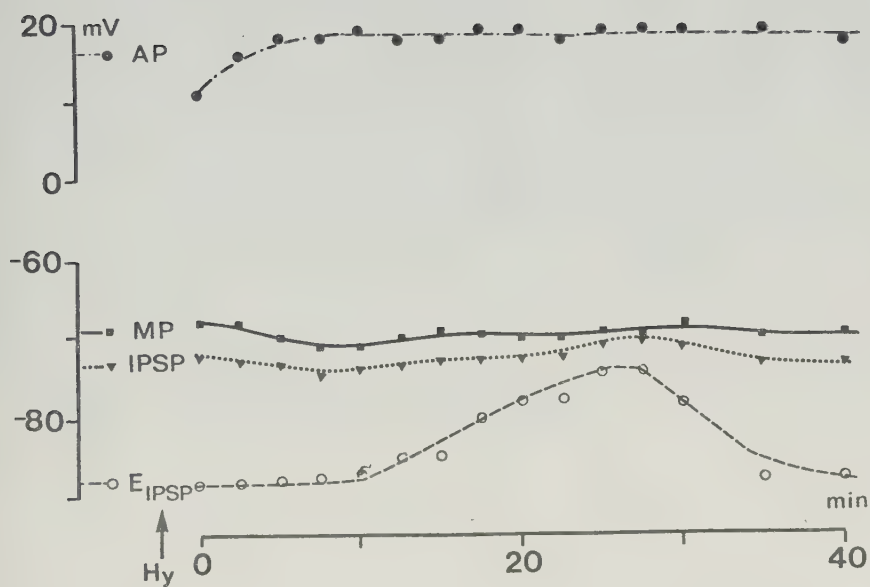


Abb. 7: Zeitverlauf der Wirkung von Hydrazin (1.5 mM pro kg KG i.v.) auf Membranpotential, Aktionspotential, IPSP und inhibitorisches Gleichgewichtspotential (E_{IPSP}) eines PBST-Motoneurons.

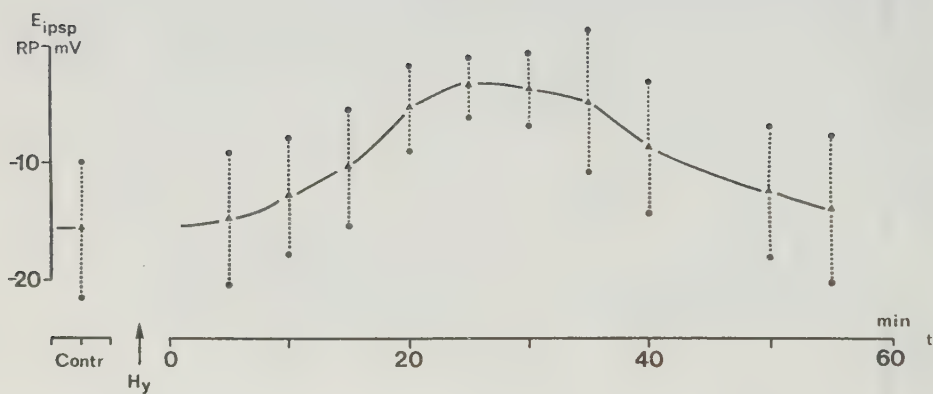
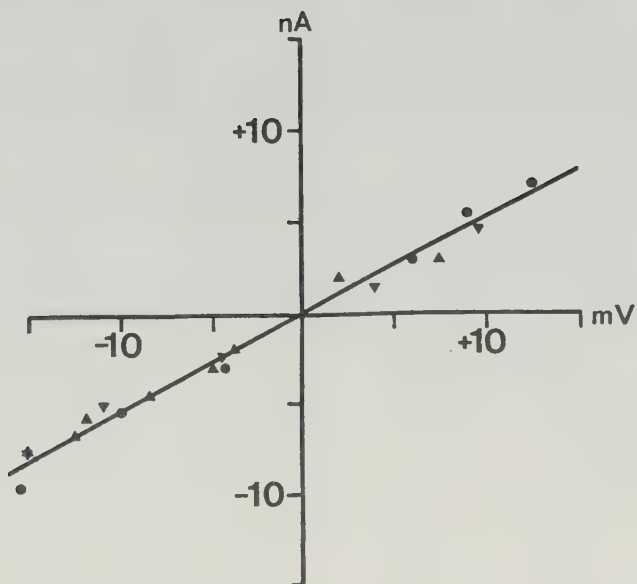


Abb. 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung des inhibitorischen Gleichgewichtspotentials (E_{IPSP}) bei 17 Motoneuronen nach intravenösen Hydrazingaben von 1.0 (n=6) und 1.5 mM/kg KG (n=11). E_{IPSP} ist in seiner Lage relativ zum Ruhepotential dargestellt.



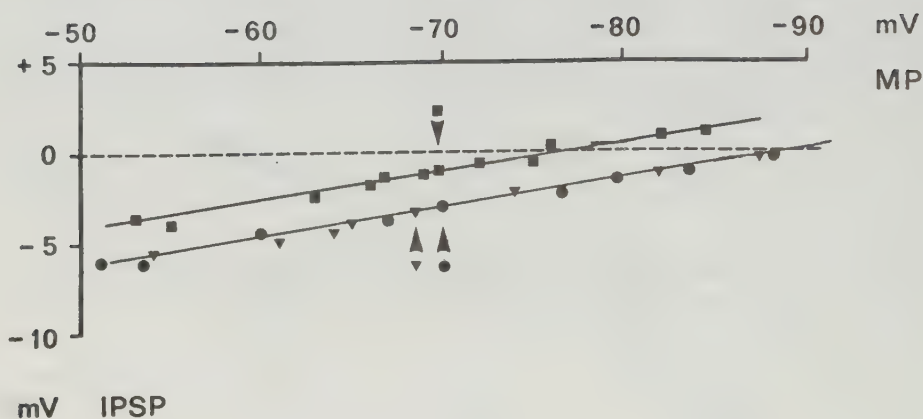


Abb. 10: Amplitude und Polarität des IPSP eines PBST-Motoneurons bei Veränderung des Membranpotentials durch Strominjektion vor (●), 30 min. (■) und 48 min. (▼) nach Hydrazin (1.5 mM pro kg KG i.v.). Die Pfeile markieren jeweils das Membranruhepotential. Die Schnittpunkte der Geraden mit der gestrichelten Null-Linie der IPSP-Amplitude geben die jeweiligen inhibitorischen Gleichgewichtspotentiale (E_{IPSP}) an.

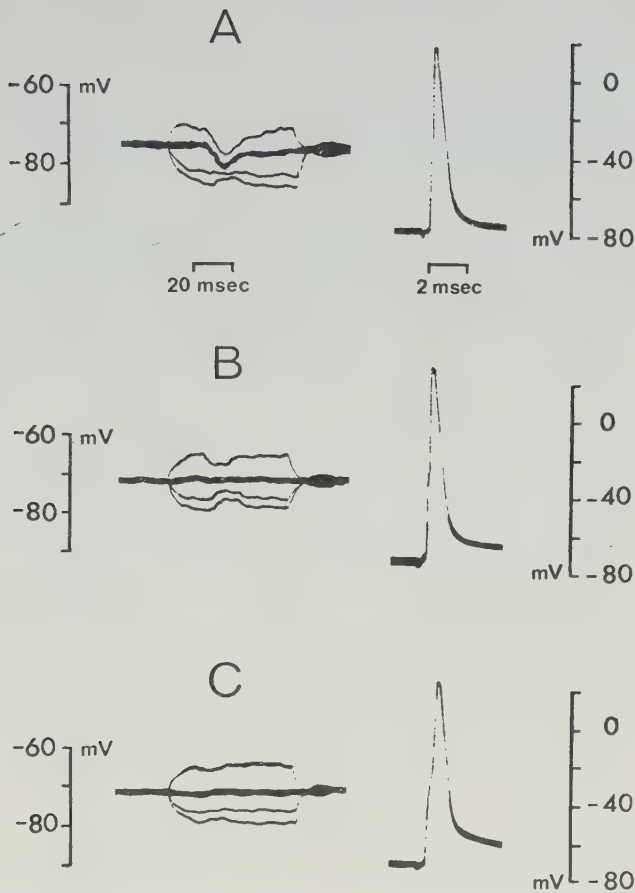


Abb. 11: IPSP und antidrom ausgelöstes AP eines TIB-Motoneurons vor (A), 30 min. (B) und 70 min. (C) nach Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.). Hier ist keine Rückbildung der Hydrazinwirkung zu beobachten, sondern ein zunehmendes Nachlassen der synaptischen Übertragung bei erhaltener antidromer Erregbarkeit. Die Reizintensitäten sind in A, B und C unverändert.

3.2.3 Intrazelluläre Cl^- -Injektion

Ein der oben beschriebenen Wirkung des Hydrazins vergleichbarer disinhibitorischer Effekt mit depolarisierender Verlagerung des E_{IPSP} wurde 1970 von LUX et al. für Ammonium berichtet. Durch den Nachweis einer verlängerten Cl^- -Extrusionszeit nach intrazellulärer Injektion dieses Ions konnte LUX (1971) diese postsynaptische Disinhibition auf die Änderung des Cl^- -Konzentrationsgradienten über der Membran nach ammoniumbedingter Ausschaltung eines zellauswärts gerichteten Cl^- -Transports zurückführen. Es lag deshalb nahe, Hydrazin auf einen ähnlichen Effekt hin zu überprüfen.

Zu diesem Zweck führten wir an 5 Motoneuronen wiederholte Cl^- -Injektionen jeweils vor und nach Hydrazingabe (1.5 mM/kg KG i.v.) durch. An 3 Motoneuronen gelangen vollständige Beobachtungen, an je einem Motoneuron konnten nur die Werte vor bzw. nach Hydrazin gemessen werden.

Zur Injektion (50 nA; 60 sec) wurde eine Konstantstrom-Iontophoreseeinheit benutzt, wie sie bei LUX et al. (1970) beschrieben ist.

Da für diese Versuche im Gegensatz zu den üblichen Citrat-Elektroden Cl^- -Elektroden verwendet werden mußten (s. Methoden), waren die Ausgangswerte für E_{IPSP} gegenüber den oben berichteten durch die kontinuierliche Diffusion von Cl^- aus der Elektrodenspitze in die Zelle um 5 bis 10 mV in depolarisierender Richtung verschoben.

Die Wirkung einer intrazellulären Cl^- -Iontophorese auf das IPSP und das E_{IPSP} illustrieren die Abbildungen 12 bis 14. Das IPSP hat unmittelbar nach Beendigung der Injektion einen depolarisierenden Verlauf und erreicht in der Regel innerhalb von einer Minute wieder die Kontrollwerte vor der Injektion.

Da angenommen werden darf (COOMBS et al., 1955; LUX et al., 1970; LUX, 1971), daß die elektromotorische Kraft der postsynaptischen Hemmung, das E_{IPSP} , weitgehend oder sogar ausschließlich vom transmembranalen Konzentrationsgradienten für Cl^- -Ionen bestimmt wird, bewirkt die intrazelluläre Cl^- -Konzentrationserhöhung eine erhebliche Verminderung der inhibitorischen Elektrogenese. Die gemessene Rückbildungszeit für die hyperpolarisierende Inhibition entspricht dann dem Zeitbedarf für die Wiederherstellung des "normalen" Cl^- -Konzentrationsgradienten.

Unter Hydrazin bewirken die Cl^- -Injektionen eine größere Verschiebung des E_{IPSP} und eine verzögerte Rückbildung von ΔE_{IPSP} im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 12 bis 14).

Wie aus Abb. 14 zu ersehen ist, hat ΔE_{IPSP} nach einer Cl^- -Injektion einen annähernd exponentiellen Rückbildungsverlauf (s. auch COOMBS et al., 1955; ARAKI et al., 1961; ECCLES et al., 1964; CURTIS et al., 1968; LUX, 1971). Die von uns bestimmten Zeitkonstanten dieser Rückbildung betrugen vor Hydrazin 23.8 ± 6.4 sec und nach Hydrazin 43.5 ± 12.7 sec, was einer Verlängerung um den Faktor 1.8 entspricht. Die Cl^- -bedingte E_{IPSP} -Verschiebung betrug vor Hydrazin 16 ± 3.8 mV gegenüber 26.5 ± 6.5 mV nach Hydrazin, d.h. sie wurde um den Faktor 1.7 vergrößert. Allen Mittelwerten liegen 8 Messungen zugrunde.

Unmittelbar nach Bendigung der Cl^- -Injektion war das Membranpotential um maximal 7 mV depolarisiert, erreichte aber innerhalb von etwa 30 sec wieder den Ausgangswert.

Die E_{IPSP} konnten, insbesondere bei größeren Verschiebungen, nicht immer direkt bestimmt werden; sie wurden dann durch graphische Darstellung der MP-IPSP-Beziehung (wie in Abb. 10) ermittelt.

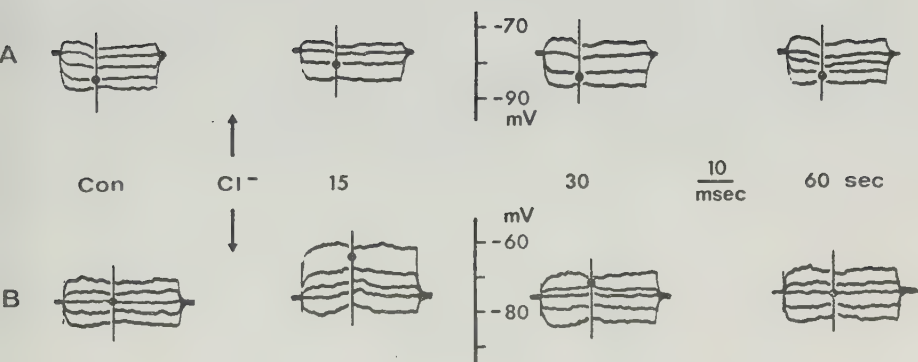


Abb. 12: Wirkung einer intrazellulären Chloridinjektion (50 nA; 60 sec) auf IPSP und E_{IPSP} eines PBST-Motoneurons vor (A) und 25 min. nach (B) Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.). Die Punkte bezeichnen jeweils das E_{IPSP} . Die Aufnahmen entstanden unmittelbar vor und 15, 30 und 60 sec nach der Cl^- -Injektion.

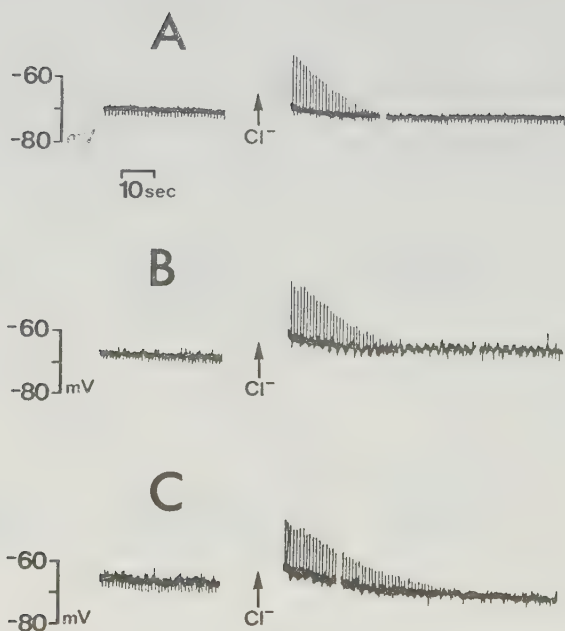


Abb. 13: Wirkung einer intrazellulären Chloridinjektion (50 nA; 60 sec) auf das IPSP eines α -Motoneurons vor (A), 20 min. (B) und 40 min. (C) nach Hydrazin (1.0 mM/kg KG i.v.). Das IPSP wird mit einer Frequenz von 1/sec ausgelöst und hat nach der Cl^- -Injektion einen depolarisierenden Verlauf. Unter Hydrazin wird die Wiederkehr hyperpolarisierender IPSPs deutlich verzögert.

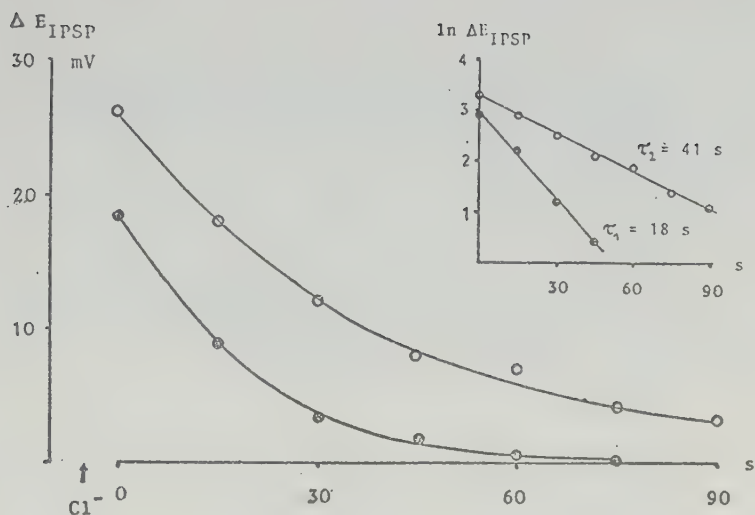


Abb. 14: Zeitverlauf der Verschiebung des Umkehrpotentials des IPSP (ΔE_{IPSP}) eines PBST-Motoneurons nach intrazellulären Chloridinjektionen vor (●) und 30 min. nach (○) intravenöser Hydrazingabe (1.5 mM/kg KG). Wie aus der kleineren halb-logarithmischen Darstellung zu ersehen ist, haben beide Kurven einen angenähert exponentiellen Verlauf mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 18$ s und $\tau_2 = 41$ s.

3.3 Präsynaptische Hemmung: Hinterwurzelpotential (DRP) und Vorderwurzelreflex (VRR)

Zusätzlich zu den Untersuchungen über die postsynaptische Hemmung wurden noch 6 Experimente durchgeführt, um die Wirkung von Hydrazin auf die präsynaptische Hemmung zu überprüfen.

Abb. 15 gibt in Anlehnung an SCHMIDT (1971) ein einfaches Beispiel für die vermutete Verschaltung der präsynaptischen Hemmung.

Ein konditionierender Reiz der Flexorafferenzen (S_2) bewirkt über axo-axonale Synapsen im Terminalgebiet eine transmitterinduzierte Depolarisation der benachbarten Extensorafferenzen, die sog. "primär afferente Depolarisation" (PAD). Ein durch den nachfolgenden Testreiz (S_1) ausgelöstes Aktionspotential in den Extensorafferenzen wird durch diese Vordepolarisation in seiner Amplitude verkleinert. Da die Menge des an der Synapse ausgeschütteten Transmitters von der Größe des präsynaptischen Aktionspotentials abhängt (DEL CASTILLO und KATZ, 1954; HAGIWARA und TASAKI, 1958; TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1962; MILEDI und SLATER, 1966), wird bei der Umschaltung auf das efferente Neuron weniger Transmitter freigesetzt. So wird die exzitatorische Wirkung durch einen noch vor der erregenden Synapse angreifenden Mechanismus abgeschwächt, man spricht von "präsynaptischer Hemmung" (FRANK und FUORTES, 1957; ECCLES et al., 1961; Übersicht bei SCHMIDT, 1971).

Da die direkte Registrierung der PAD wegen des geringen Faserdurchmessers technisch sehr schwierig ist, beobachteten wir zwei meßtechnisch leichter zugängliche Parameter, die allgemein als (indirektes) Maß für die prasynaptische Hemmung angesehen werden (SCHMIDT, 1971):

das Hinterwurzelpotential (DRP), das der retrograden elektrotonischen Ausbreitung der PAD in den Extensorfasern entspricht und

die Amplitudenverkleinerung eines durch einen Testreiz ausgelösten Vorderwurzelreflexes (VRR) durch einen vorangehenden konditionierenden Reiz.

Hierbei bestand der Testreiz jeweils aus einem einzelnen Rechteckimpuls von 1.2-facher Schwellenintensität (1.2 T) auf die Extensorafferenzen, der konditionierende Reiz, der 70 msec vorher erfolgte, aus 4 Einzelimpulsen von 2-facher Schwellenintensität (2 T) und einer Frequenz von 200 Hz auf die Flexorafferenzen.

Zur Erzielung zuverlässiger Resultate wurden jeweils 15 Einzelsignale (DRP bzw. VRR) mit einem Digitalrechner (DIDAC 800) gemittelt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt. Die Amplitude des DRP (5 Experimente) zeigte nach einer initialen, maximal 10 min dauernden Vergrößerung 30 min nach Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.) eine deutliche Verkleinerung, die im Mittel $16.3 \pm 7\%$ (n = 5) betrug. Diese Amplitudenabnahme war zwar in keinem der Fälle voll reversibel, zeigte jedoch in allen Fällen eine Tendenz zur Rückbildung (Abb. 16 oben und Mitte). Dieser Befund deutet auf

eine Verkleinerung der PAD unter Hydrazin hin.

In einem Einzelversuch wurde noch der Einfluß konditionierender Reizung (wie oben erläutert) auf den VRR unter Hydrazin untersucht (Abb. 16 unten). Während vor Hydrazin die Reflexamplitude durch Konditionierung um 56% im Vergleich zur Testreflexamplitude vermindert wurde, betrug die Verminderung 22 min nach Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.) nur noch 40%. Nach etwa 40 min war wieder die volle Hemmwirkung zu beobachten. Hydrazin bewirkte also eine reversible Abnahme der Effektivität dieses Hemmungsmechanismus um 28,6%, was ebenfalls auf eine Verkleinerung der PAD schließen läßt.

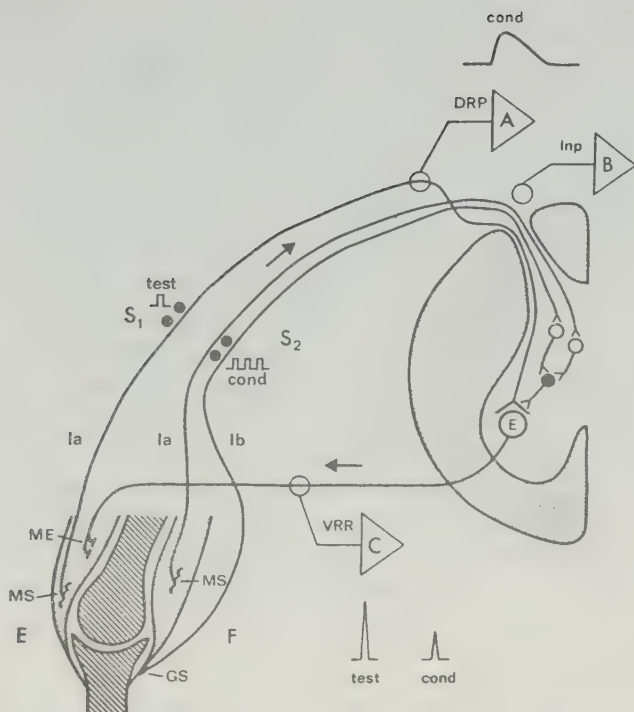


Abb. 15: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Untersuchung der präsynaptischen Hemmung (nur Ia- und Ib-Afferenzen gezeichnet, Somata der afferenten Neurone weglassen). Ein konditionierender Reiz der Flexorafferenzen (S₂), für den die Schwellenbestimmung durch Ableitung des afferenten Summenaktionspotentials (Inp) an der Eintrittsstelle der Hinterwurzel erfolgt, löst über einen axo-axonalen synaptischen Mechanismus im Bereich der terminalen Extensorafferenzen eine depolarisierende Membranpotentialschwankung, die "primär afferente Depolarisation" (PAD) aus. Die antidrome Ausbreitung dieser PAD kann an einem Hinterwurzelfilament als Hinterwurzelpotential (DRP) registriert werden. Durch die PAD wird die Amplitude der durch den Testreiz (S₁) ausgelösten afferenten Aktionspotentiale vermindert und an den exzitatorischen Synapsen wird weniger Transmitter ausgeschüttet. Der Vorderwurzelreflex (VRR), das an der Vorderwurzel abgeleitete Summenaktionspotential, wird demgemäß durch einen präsynaptischen Mechanismus verkleinert: "präsynaptische Hemmung".

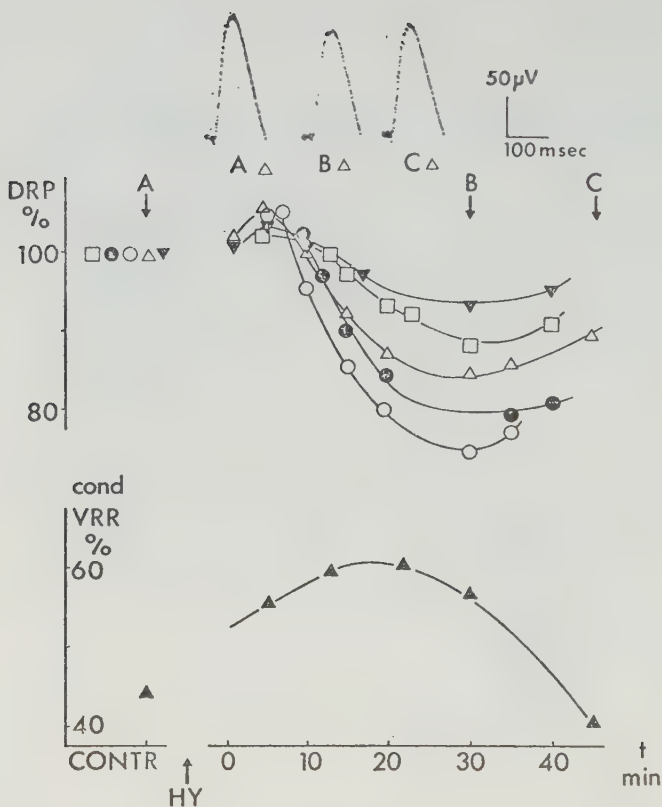


Abb. 16: Zeitverlauf der Wirkung von Hydrazin (1.5 mM/kg KG i.v.) auf das Hinterwurzelpotential (DRP; 5 Experimente) und auf die Amplitude des konditionierten Vorderwurzelreflexes (VRR; 1 Experiment).

Das DRP wurde durch Reizung von Flexorafferenzen (4 Einzelreize; 200/sec; 2 T) ausgelöst, Beispiele hierfür sind ganz oben dargestellt.

Der VRR wurde durch Reizung von Extensorafferenzen (1 Einzelreiz; 1.2 T) ausgelöst und 70 msec vorher durch 4 Einzelreize (200/sec; 2 T) auf die Flexorafferenzen konditioniert; die Größenangabe erfolgt in Prozent des (unkonditionierten) Testreflexes.

4 Diskussion

4.1 Elektrocorticogramm

Die Ableitung erfolgte im sensomotorischen Cortex. Die beobachtete tonisch-klonische Aktivität entspricht weitgehend den Befunden beim generalisierten Krampfanfall. Die krampfinduzierende Wirkung des Hydrazins ist also nicht auf das Rückenmark beschränkt, worauf auch eine ausgeprägte Pupillendilatation und eine Hypersalivation der Tiere unter Hydrazin schließen ließ.

4.2 Intrazelluläre Ableitungen

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen deutlich zwei Wirkungskomponenten des Hydrazins erkennen. Eine früh (nach 20 bis 30 min) eintretende spezifische Wirkung auf die spinalen Hemmungsmechanismen (post- und präsynaptische Hemmung), die eine deutliche Tendenz zur Reversibilität zeigt, und eine später (nach etwa 60 min) zu beobachtende unspezifische, offenbar allgemein toxische Wirkung (Nachlassen der synaptischen Übertragung, Depolarisation der Neurone), die schließlich zum Tod des Tieres führt. Wir sehen in dieser Spätwirkung den Ausdruck der erheblichen Veränderungen des Kohlenhydrat- und Aminosäurenstoffwechsels, wie sie für Hydrazin als Korrelat seiner allgemeinen Toxizität beschrieben sind (CLARK et al., 1968).

Daß sich im ECoG nicht dieselbe Tendenz zur Reversibilität der Hydrazinwirkung zeigte, wie sie die Rückenmarksableitungen erkennen ließen, läßt auf eine möglicherweise verschiedenartige Wirkung des Hydrazins in verschiedenen Regionen des ZNS schließen, bzw. auf unterschiedliche Empfindlichkeit differenter Strukturen des ZNS gegenüber der spezifischen bzw. der allgemeintoxischen Wirkung des Hydrazins.

Bei den geringfügigen Veränderungen von Membran- und Aktionspotential, die in der ersten Zeit nach der Hydrazininjektion zu beobachten waren, dürfte es sich um experimentell bedingte Artefakte handeln, etwa lokale Pulsationen und Blutdruckschwankungen als Folge der Infusion. Die geringfügige Depolarisation (1.5 mV), die auch nach diesen anfänglichen Schwankungen noch bestehen blieb, läßt sich aus der vermuteten Verringerung des Cl^- -Gleichgewichtspotentials (siehe unten) erklären unter der Annahme, daß Cl^- an der Ruhemembranpotentialbildung beteiligt ist. Diese Annahme ist berechtigt, da der Anteil der Cl^- -Leitfähigkeit an der gesamten Ruhemembranleitfähigkeit von COOMBS et al. (1955) auf 20 bis 30% und von LUX (1972) auf 10 bis 30% geschätzt wurde.

Sonstige signifikante Veränderungen, insbesondere von EPSP und AP, die einer spezifischen Hydrazinwirkung zuzuordnen gewesen wären, konnten wir nicht beobachten.

Hervorzuheben ist hier noch, daß der neuronale Eingangswiderstand R_N unverändert blieb, sodaß sich kein Anhalt für eine Veränderung der ionalen Leitfähigkeiten der Ruhemembran ergab. Es konnte auch keine gesteigerte Erregbarkeit, etwa in Form eines Anwachsens von R_N , festgestellt werden.

4.2.1 Postsynaptische Hemmung

Wie oben dargestellt, ließ sich eine eindeutige, überwiegend reversible Wirkung von Hydrazin auf die postsynaptische Hemmung nachweisen.

Die unveränderte Steilheit der Beziehung zwischen MP und IPSP (siehe Abb. 10) spricht hierbei gegen einen präsynaptischen Angriffspunkt des Hydrazins, etwa in Form einer kompetitiven oder nichtkompetitiven Hemmung der Transmitter-Rezeptor-Interaktion oder einer verminderten Freisetzung bzw. eines beschleunigten Abbaus des hemmenden Transmitters. Aus dem gleichen Grund kann auch angenommen werden, daß die Leitfähigkeit (hauptsächlich für Cl^-) der inhibitorisch aktivierten Membran unverändert blieb.

Vielmehr muß die Ursache dieser Disinhibition in einer Verringerung der inhibitorischen treibenden Kraft (Depolarisation von E_{IPSP}) gesehen werden. Nach neueren Befunden kann man davon ausgehen, daß die inhibitorische Elektrogenese an vielen Präparaten hauptsächlich oder sogar ausschließlich vom transmembranalen Cl^- -Konzentrationsgradienten bestimmt ist. Dies gilt für das spinale Motoneuron (LUX, 1971) und das Trochlearis-Motoneuron der Katze (LLINAS und BAKER, 1972; LLINAS et al., 1974), den Streckrezeptor des Krebses (OZAWA und TSUDA, 1973; MEYER und LUX, 1974; MEYER, 1976), die Muskelfaser des Hummers (MOTOKIZAWA et al., 1969) und des Krebses (BOISTEL und FATT, 1958; TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1967) und die olivo-cochleare Inhibition der Katze (DESMEDT und ROBERTSON, 1975).

Hiernach kann das E_{IPSP} als Cl^- -Potential aufgefaßt werden, das über die Nernst'sche Beziehung

$$E_{IPSP} = E_{Cl} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{(Cl)_i}{(Cl)_a}$$

vom Cl^- -Konzentrationsgradienten über der Membran abhängt. Hierbei bedeutet $(Cl)_i$ und $(Cl)_a$ die intra- und extrazelluläre Cl^- -Konzentration (Mol/l), R die universelle molare Gaskonstante (8,31 J/°K·Mol), T die absolute Temperatur (°K), z die Wertigkeit des betrachteten Ions und F die Faraday-Konstante (96 500 Amp·sec/Mol).

Diese Abhängigkeit der inhibitorischen Elektrogenese vom transmembranalen Cl^- -Konzentrationsgradienten konnte inzwischen durch direkte Messungen der intrazellulären Cl^- -Aktivität mit Cl^- -sensitiven Mikroelektroden bestätigt werden (LUX, 1974; DEISZ und LUX, 1976).

Da E_{IPSP} jedoch negativer als das Ruhemembranpotential ist, muß der Cl^- -Konzentrationsgradient über der Membran größer sein als bei einer rein passiv-diffusionalen Verteilung im Gleichgewicht mit dem Membranpotential, d.h. eine entsprechend niedrige $(Cl)_i$ muß durch einen aktiven Mechanismus, eine nach außen gerichtete Cl^- -Pumpe aufrecht erhalten werden (vgl. LUX, 1971).

Um die beobachtete Depolarisation von E_{IPSP} unter Hydrazin zu erklären, muß demnach eine Änderung der Cl^- -Verteilung über der Membran angenommen werden, wahrscheinlich über die Blockierung der Cl^- -Pumpe.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die intrazellulären Cl^- -Injektionen mit nachfolgender Beobachtung der Cl^- -Extrusionskinetik durchgeführt.

Die unter Hydrazin nachgewiesene deutliche Verlängerung der Rückbildungszeit für hyperpolarisierende IPSPs (als Maß für die Cl^- -Extrusionszeit) sowie die Vergrößerung der Cl^- -bedingten E_{IPSP} -Verschiebung sprechen, im Zusammenhang mit der weitgehenden Äquilibration des E_{IPSP} mit dem MP, für eine erhebliche Beeinträchtigung des aktiven, zellauswärts gerichteten Cl^- -Transports und unterstützen die oben gemachte Annahme.

Das Fehlen einer eindeutigen Dosis-Wirkungs-Beziehung für die beiden gewählten Dosierungen von 1.0 und 1.5 mM/kg KG wird verständlich, wenn man annimmt, daß beide Dosierungen eine nahezu maximale Wirkung auslösen. Eine deutlich Abhängigkeit der Wirkung von der applizierten Menge wäre dann erst für niedrigere Dosierungen zu erwarten. Die Untersuchung einer derartigen Beziehung war jedoch nicht Ziel dieser Studie.

4.2.2 Quantitative Betrachtung der Cl^- -Injektion

Rückbildung von E_{IPSP} und Abfall der intrazellulären Cl^- -Konzentration nach der Injektion

Unter den vereinfachenden Annahmen, daß die extrazelluläre Cl^- -Konzentration konstant bleibt und daß die intrazelluläre Cl^- -Konzentration räumlich gleichförmig ist, bzw. daß die Zeitkonstanten für die intrazellulären Konzentrationsausgleichsvorgänge erheblich kürzer sind als die Zeitkonstanten des transmembranalen Konzentrationsausgleichs (vgl. COOMBS et al., 1955; LUX, 1972), kann man den diffusional bestimmten Abfall der intrazellulären Cl^- -Konzentration $(\text{Cl})_i$ auf den Ausgangswert $(\text{Cl})_i^c$ nach einer durch eine Cl^- -Injektion erzielten Konzentrationserhöhung $\Delta(\text{Cl})_i$ mit folgender Formel beschreiben (vgl. COOMBS et al., 1955):

$$(Cl)_i = (Cl)_i^c + \Delta(Cl)_i e^{-t/\tau}$$

wobei τ die Zeitkonstante dieses Vorgangs ist, die im diffusionalen steady-state und bei gleichförmiger intrazellulärer Konzentration über

$$\tau = \frac{V}{A \cdot P}$$

vom Zellvolumen V (cm^3), der Zelloberfläche A (cm^2) und der Cl^- -Permeabilität P (cm/sec) abhängt (vgl. COOMBS et al., 1955; LUX, 1972).

Dies ergibt rein exponentielle Abklingkurven, wie sie in Abb. 17 dargestellt sind. Da das $E_{\text{IPSP}} = E_{\text{Cl}^-}$ über die Nernst'sche Formel logarithmisch vom Cl^- -Konzentrationsverhältnis abhängt, weichen die diesem Modell entsprechenden Rückbildungskurven für das E_{IPSP} geringfügig von der rein exponentiellen Form des Abfalls ab (Abb. 18). Paßt man die Werte mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate an eine exponentielle Kinetik an, so ergibt sich eine Verlängerung der Zeitkonstanten um den Faktor 1,2 (s. Abb. 19). Die von uns beobachtete Zeitkonstante der E_{IPSP} -Rückbildung ist also etwas länger als die Zeitkonstante des Cl^- -Konzentrationsabfalls, der dem in seinem zeitlichen Verlauf gemessenen Parameter (ΔE_{IPSP}) zugrunde liegt.

Wenn man weiter berücksichtigt, daß die Cl^- -Pumpe nicht vollständig geblockt war, da E_{IPSP} im Mittel noch immer leicht hyperpolarisierend war, dann dürfte die wahre Zeitkonstante für die passive Cl^- -Rückverteilung zwischen 40 und 50 sec liegen.

Die von uns ermittelten Werte für τ (23.8 und 43.5 sec vor bzw. nach Hydrazin) stimmen gut mit den von LUX (1971) für Ammonium gemessenen Werten überein (22.0 gegenüber 43.8 sec).

Anstieg der intrazellulären Cl^- -Konzentration durch Diffusion aus der Elektrodenspitze

Um die Cl^- -Injektionen durchführen zu können, benutzten wir mit 0.5 M KCl-Lösung gefüllte Mikroelektroden (s. Methoden). Die Konzentration der KCl-Lösung durfte nicht zu niedrig gewählt werden, damit dem Iontophorese-Stromfluß nicht ein zu hoher Ohm'scher Widerstand entgegengesetzt wurde.

Wegen der niedrigen intrazellulären Cl^- -Konzentration (5 bis 6 mM/l) besteht nach dem Einstechen der Mikroelektrode ein erhebliches Konzentrationsgefälle für Cl^- -Ionen zwischen der Mikroelektrodenspitze und dem Zellinneren. Dies hat einen diffusionsbedingten Cl^- -Einstrom in die Zelle zur Folge, der nach einer Abschätzung von COOMBS et al. (1955) für Elektrodenwiderstände zwischen 5 und 10 MOhm in der Größenordnung von 0.05 pM/sec liegt. Dadurch wird die intrazelluläre Cl^- -Konzentration um einen Betrag erhöht, der von diesem Flux und der Zeitkonstante für den Cl^- -Konzentrationsausgleich über der Membran abhängt. Für die von uns gemessenen Zeitkonstanten von etwa 20 und etwa 40 sec (vor bzw. nach Hydrazin) kann man abschätzen, daß bei intakter Pumpe etwa $0.05 \cdot 20 = 1$ (pM) und nach Pumpenblock etwa $0.05 \cdot 40 = 2$ (pM) allein durch diese Diffusion zugeführt werden.

Wenn man aus den in der Literatur beschriebenen und den oben berichteten Befunden ein mittleres E_{IPSP} = E_{Cl} von -85 mV bei $(\text{Cl})_a = 125$ mM/l zugrunde legt,

beträgt die $(Cl)_i$ unter Benutzung der Nernst'schen Beziehung 5.2 mM/l. Diese Konzentration würde bei einem angenommenen mittleren Zellvolumen von $4.1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3$ (LUX und SCHUBERT, 1975) nach Einstechen der Cl^- -gefüllten Elektrode auf 7.6 mM/l (vor Hydrazin) bzw. 10.1 mM/l (nach Hydrazin) ansteigen, was einer Reduktion des E_{IPSP} auf -74.8 mV bzw. -67.2 mV entspricht. Verminderungen des E_{IPSP} in dieser Größenordnung wurden von uns beobachtet. In der Regel war bei Benutzung von Cl^- -Elektroden das E_{IPSP} vor Hydrazin drastisch reduziert und unter Hydrazin mit dem MP equilibriert (vgl. Abb. 12).

Anstieg der intrazellulären Cl^- -Konzentration während der Injektion

Schwieriger ist die Abschätzung des $(Cl)_i$ -Anstiegs während der Cl^- -Injektion. Wenn man von den oben ausgeführten vereinfachenden Annahmen ausgeht, die den Einfluß von Potentialänderungen und die Komplexität der neuronalen Geometrie außer acht lassen, dann strebt $(Cl)_i$ während der Injektion vom Ausgangswert $(Cl)_i^C$ aus exponentiell einem steady-state-Wert $(Cl)_i^C + \Delta(Cl)_i^S$ zu:

$$(Cl)_i = (Cl)_i^C + \Delta(Cl)_i^S (1 - e^{-t/\tau})$$

wobei t (sec) die Injektionsdauer und τ (sec) die Zeitkonstante des diffusionalen Cl^- -Konzentrationsausgleichs bedeutet.

Der Betrag $\Delta(Cl)_i^S$ gibt den steady-state-Wert des Konzentrationszuwachses an und ist dem Injektions-

strom und der diffusionalen Ausgleichszeitkonstanten für Cl^- direkt proportional:

$$\Delta(\text{Cl})_i^s = \frac{I \cdot t_n}{F \cdot V} \tau$$

Hierbei bedeutet I den Injektionsstrom, F die Faraday-Konstante, V das Zellvolumen, τ die Zeitkonstante und t_n die Cl^- -Transportzahl des Elektrodenstroms, die angibt, zu welchem Anteil der angelegte negative Strom von Cl^- -Ionen getragen wird.

Nach Einsetzen der Zahlenwerte $I = 50 \cdot 10^{-9}$ (Amp), $t = 60$ (sec), $F = 96\,500$ (Amp.sec/Mol), $V = 4.1 \cdot 10^{-10}$ (l), $t_n = 0.7$ (nach einer Abschätzung von LUX, 1972) und $\tau = 20$ bzw. 40 (sec) vor bzw. nach Hydrazin, ergeben sich durch die Injektion bewirkte Konzentrationsänderungen von 16.8 bzw. 27.5 mM/l.

Es ist jedoch hierbei zu berücksichtigen, daß die Injektion die Zahl der osmotisch wirksamen Teilchen im Zellinneren vermehrt. Ein kompensatorischer Wassereinstrom in die Zelle zur Konstanthaltung des osmotischen Drucks begleitet deshalb die Injektion. Dadurch ist der effektive Konzentrationszuwachs kleiner als der oben berechnete.

Aus Gründen der Elektroneutralität muß für jedes durch die Injektion zugeführte Cl^- -Ion ein K^+ -Ion in die Zelle einströmen. Bei einer Osmolarität von 0.3 ösm/l und einem Volumen von $4.1 \cdot 10^{-10}$ l enthält die Zelle vor der Injektion $123 \cdot 10^{-12}$ ösm osmotisch wirksamer Teilchen. Die oben angegebenen Konzentrationsänderungen entsprechen dann auf das Zellvolumen bezogen einer Vermehrung der Anzahl dieser Teilchen um 13 bzw. $22 \cdot 10^{-12}$ ösm, d.h. um 11 bzw. 18%. Dem gemäß wird das Zellvolumen

um den Faktor 1.11 bzw. 1.18 größer. Der tatsächliche $(Cl)_1$ -Zuwachs beträgt also nach entsprechender Korrektur $\frac{16.8}{1.11} = 15.1 \text{ mM/l}$ (vor Hydrazin) und $\frac{27.5}{1.18} = 23.3 \text{ mM/l}$ (nach Hydrazin). Diese Werte wurden den Berechnungen der Abb. 19 zugrundegelegt, und lassen sich, wie zu ersehen ist, gut mit experimentellen Befunden vereinbaren.

Einschränkend muß jedoch noch angemerkt werden, daß die verwendeten Zeitkonstanten von 20 bzw. 40 sec etwas zu groß sind. Sie wurden bei Potentialwerten um das Ruhepotential ermittelt und sind nur hierfür gültig. Hyperpolarisiert man jedoch die Zelle durch Injektion von negativem Strom, so vergrößert sich die treibende Kraft für den Auswärtstransport von Anionen, was sich in einer Verkürzung der Zeitkonstanten ausdrückt (vgl. COOMBS et al., 1955). Die angegebenen Zuwachsbeträge stellen deshalb obere Grenzwerte dar.

Außerdem ist festzustellen, daß diese quantitativen Betrachtungen streng genommen nur für den Fall des rein passiven Konzentrationsausgleichs, d.h. bei blockierter Pumpe, angewendet werden dürfen und für die Verhältnisse bei eingeschalteter Pumpe nur dann gelten, wenn angenommen wird, daß aufgrund einer linear konzentrationsabhängigen Pumpe eine rein exponentielle Kinetik erhalten bleibt.

Es läßt sich jedoch, wie LUX (1972) gezeigt hat, auch eine quadratisch konzentrationsabhängige Pumpe gut mit den experimentellen Daten vereinbaren.

Inwieweit die Behandlung dieser Probleme durch die Berücksichtigung der Besonderheiten der neuronalen Geometrie modifiziert werden muß, wurde ebenfalls bei LUX (1972) behandelt.

Die von uns beobachteten Membrandepolarisationen unmittelbar nach Beendigung der Injektion lassen sich auf der Basis eines nicht unerheblichen Anteils der Cl^- -Leitfähigkeit an der Ruhemembranleitfähigkeit erklären.

Im Anschluß an COOMBS et al. (1955) und LUX (1972) und unter Benutzung neuerer Daten von LUX und SCHUBERT (1975) läßt sich für den passiven Gleichgewichtszustand, d.h. bei blockierter Pumpe, der auf die neuronale Gesamtoberfläche bezogene Cl^- -Flux über die Membran in einer Richtung, AM_{Cl} , größenordnungsmäßig abschätzen zu :

$$\text{AM}_{\text{Cl}} = \frac{V \cdot (\text{Cl})_i}{\tau} = 0.08 \text{ pM/sec}$$

mit $V = 4 \cdot 10^{-10}$ (l), $(\text{Cl})_i = 10$ (mM/l) und $\tau = 50$ (sec).

Dem entspricht eine Cl^- -Leitfähigkeit von (vgl. HODGKIN, 1951):

$$G_{\text{Cl}} = \frac{F^2 \cdot z}{R \cdot T} \cdot M_{\text{Cl}} = 0.28 \cdot 10^{-6} \text{ Ohm}^{-1}$$

Bei einem mittleren Membranwiderstand R_N von etwa $1.1 \cdot 10^6$ Ohm (LUX und SCHUBERT, 1975) beträgt damit der Anteil der Cl^- -Leitfähigkeit an der gesamten Ruhemembranleitfähigkeit immerhin ca. 30% und stimmt damit gut mit den bisher angegebenen Werten (COOMBS et al., 1955; LUX, 1972) überein.

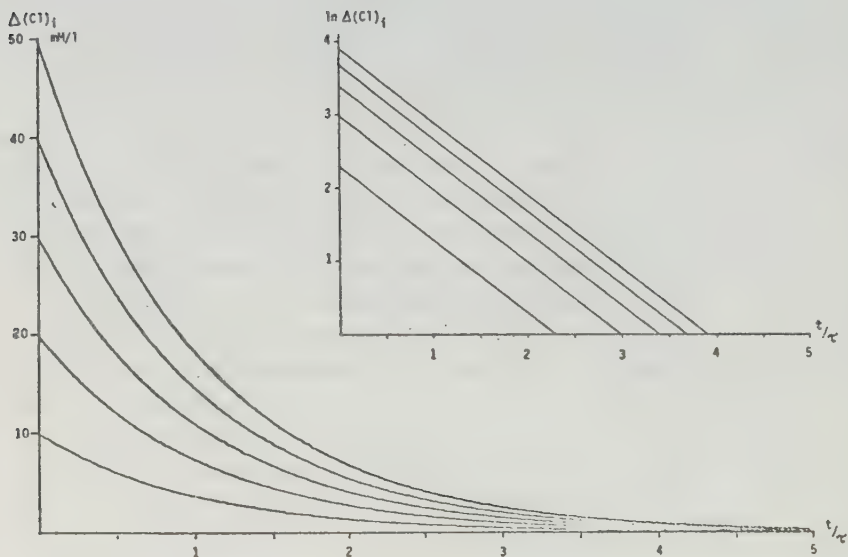


Abb. 17: Darstellung des exponentiellen Abfalls der Veränderung der intrazellulären Chloridionenkonzentration $\Delta(\text{Cl})_i$ im Maß der Zeitkonstanten τ .

Für $(\text{Cl})_i$ gilt die Gleichung

$$(\text{Cl})_i = (\text{Cl})_i^c + \Delta(\text{Cl})_i e^{-t/\tau}$$

$(\text{Cl})_i^c$ ist der Kontrollwert von $(\text{Cl})_i$ vor Injektion.

Als Ausgangskonzentrationsänderungen wurden 10 bis 50 mM/l angenommen. Aus der kleineren halblogarithmischen Darstellung läßt sich deutlich der rein exponentielle Verlauf und die Zeitkonstante τ als Reziprokwert der Steigung der einzelnen Geraden ersehen. Die Berechnung erfolgte auf einer PDP 8 .

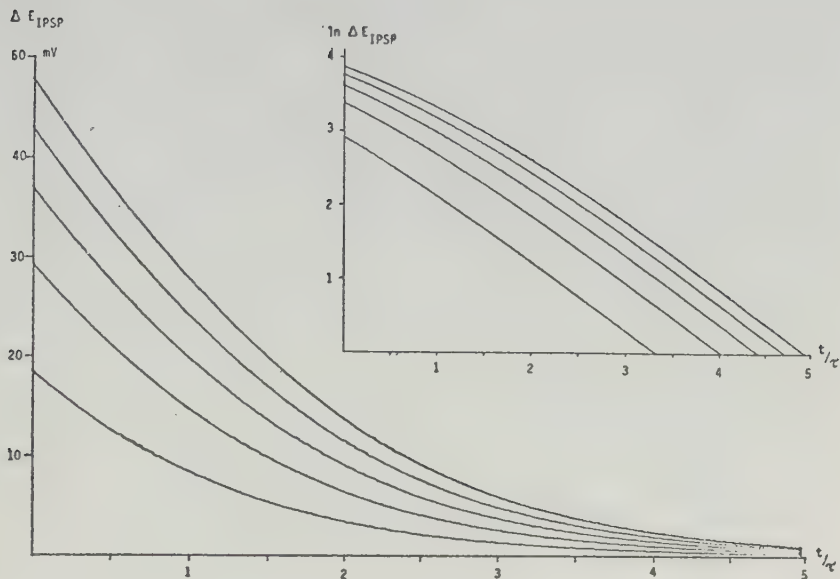


Abb. 18: Verlauf der Änderungen des inhibitorischen Gleichgewichtspotentials ΔE_{IPSP} unter Zugrundelegung der $\Delta(Cl)_i$ -Werte aus Abb. 17. Man erkennt den verzögerten Verlauf; aus der halb-logarithmischen Darstellung werden die Abweichungen von einer rein exponentiellen Abfallskinetik ersichtlich sowie die Verlängerung der Zeitkonstanten. Passt man die Daten mit linearer Regression an einen rein exponentiellen Verlauf an, so ergibt sich eine Verlängerung der Zeitkonstanten um den Faktor 1.2 ($\tau_{IPSP} = 1.2 \tau_{Cl}$). Die Berechnung erfolgte nach der Formel

$$\Delta E_{IPSP} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{(Cl)_i}{(Cl)_a} - E_{IPSP}^c$$

mit den Werten $E_{IPSP}^c = -67.5$ mV und $(Cl)_a = 125$ mM/l auf einer PDP 8.

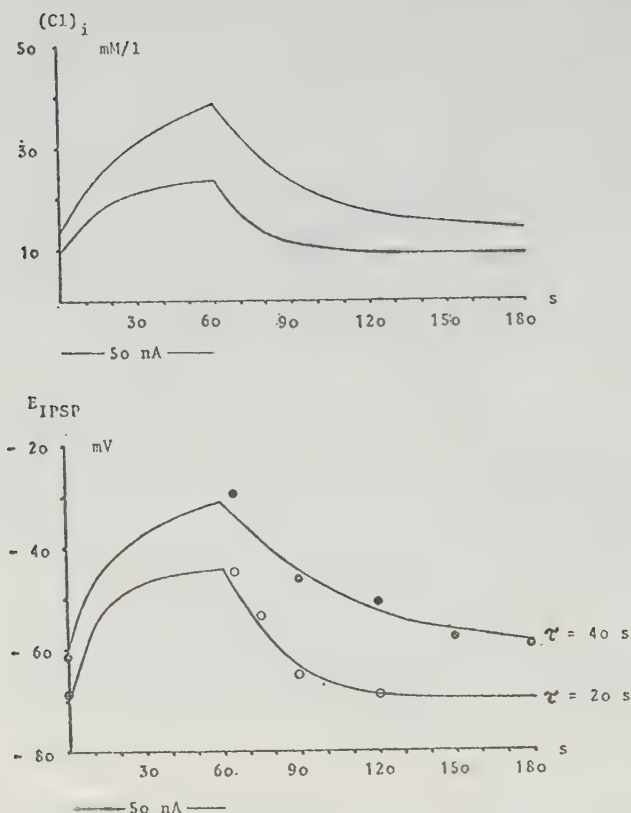


Abb. 19: Berechneter Verlauf von $(Cl)_i$ und E_{IPSP} während und nach einer Cl^- -Injektion (50 nA; 60 sec) bei rein passiver Verteilung ($\tau = 40 \text{ sec}$) und unter Einschluß einer aktiven Extrusion ($\tau = 20 \text{ sec}$). Es wurde eine linear konzentrationsabhängige Pumpe angenommen. Der $(Cl)_i$ -Anstieg wurde nach der Formel

$$(Cl)_i = (Cl)_i^C + \Delta (Cl)_i^S (1 - e^{-t/\tau})$$

berechnet, wobei

$$\Delta (Cl)_i^S = \frac{I \cdot t_n}{F \cdot V} \tau$$

Die Berechnung des $(Cl)_i$ -Abfalls und der E_{IPSP} -Werte erfolgte wie in Abb. 17 und 18. Genauere Erläuterungen siehe Text.

Die in die Kurven eingezeichneten Punkte entsprechen den an einem TIB-Motoneuron gemessenen Werten vor (○) und 30 min. nach (●) intravenöser Gabe von Hydrazin (1.5 mM/kg KG).

4.3

Präsynaptische Hemmung

Die Tatsache, daß bestimmte afferente Reize die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale in Motoneuronen verkleinern können (FRANK und FUORTES, 1957), ohne daß sie im postsynaptischen Soma eine Membranpotential- oder Leitfähigkeitsänderung auslösen (EIDE et al., 1968), hat zu verschiedenen Interpretationen Anlaß gegeben.

Neben der Vorstellung einer langdauernden "remote inhibition", die einen postsynaptischen Hemmungsmechanismus annahm, der jedoch weit entfernt im Bereich der dendritischen Verzweigungen stattfindet und deshalb mit der im Soma befindlichen Elektrode nicht nachgewiesen werden kann (FRANK, 1959), wurde das klassische Konzept der präsynaptischen Hemmung entwickelt (ECCLES et al., 1961; Übersicht bei SCHMIDT, 1971; s.a. 3.3), das jedoch immer wieder in Zweifel gezogen wurde (GRANIT, 1968; KELLERTH, 1968).

Als Alternative zu diesem synaptischen Entstehungsmechanismus der PAD oder zumindest als ihn verstärkender Faktor wurde, einer früher entwickelten Vorstellung von BARRON und MATTHEWS (1938) entsprechend, noch eine andere Möglichkeit in Erwägung gezogen: eine zunehmende extrazelluläre K^+ -Akkumulation im Bereich der terminalen Afferenzen aufgrund der afferenten Entladungen könnte zumindest teilweise die Depolarisation benachbarter Afferenzen erklären (CURTIS et al., 1971; KRNJEVIC und MORRIS, 1972; VIKLICKY et al., 1972; LIEBL et al., 1973; TEN BRUGGENCATE et al., 1974), ein Konzept, das angesichts neuerer Befunde über die Auslösung von DRPs auch nach synaptischer Blockade durch hohe extrazelluläre

Mg²⁺-Konzentrationen (VYKLICKY et al., 1976) weiter diskutiert werden muß.

Da jedoch anhand der bisher vorliegenden Befunde eine eindeutige und schlüssige Aussage über diese Zusammenhänge noch nicht möglich ist, sollen unsere Befunde auf dem Boden des klassischen Konzepts der präsynaptischen Hemmung diskutiert werden.

Als Transmitter dieses Hemmungstyps wurde inzwischen, entsprechend der ursprünglichen Vermutung von ECCLES et al. (1963), durch viele Einzelarbeiten (z.b. LEVY et al., 1971; LEVY, 1974; CURTIS et al., 1971; DAVIDSON und SOUTHWICK, 1971; Übersicht bei CURTIS und JOHNSTON, 1974; KRNJEVIC, 1974) GABA wahrscheinlich gemacht, wobei elektrophysiologische Befunde eng mit quantitativ-histochemischen korrelierten (MIYATA und OTSUKA, 1975; OTSUKA und KONISHI, 1976) und durch den direkten elektronenoptischen Nachweis einer präsynaptischen Lokalisation von GAD an axo-axonalen Kontaktstellen mittels neuer immunocytochemischer Methoden weiter untermauert wurden (McLAUGHLIN et al., 1975; WOOD et al., 1976).

GABA bewirkt jedoch über eine selektive Erhöhung der Cl⁻-Leitfähigkeit an fast allen bisher untersuchten Präparaten keine Depolarisation, sondern eine Hyperpolarisation (Übersicht bei TAKEUCHI, 1976, für Invertebraten-Neurone und bei KRNJEVIC, 1976, für Vertebraten-Neurone). 1970 jedoch konnte DE GROAT den direkten Nachweis für eine depolarisierende GABA-Wirkung auf Säugetierneurone (autonome Ganglienzellen) erbringen, ein Befund, der später für viele andere autonome und sensorische Ganglienzellen in vivo und in vitro bestätigt

wurde (DE GROAT, 1972; DE GROAT et al., 1972; ADAMS and BROWN, 1973, 1975; BOWERY und BROWN, 1974; NISHI et al., 1974; FELTZ und RASMINSKY, 1974; OBATA, 1974; KUDO et al., 1975; DESCHENES et al., 1976; LAWSON et al., 1976).

Dies steht in Einklang mit den mehr indirekten Hinweisen darauf, daß GABA die terminalen Afferenzen depolarisiert und ihre Erregbarkeit erhöht (DAVIDSON und SOUTHWICK, 1971; DAVIDOFF, 1972; BARKER und NICOLL, 1972; LEVY, 1974; GMELIN, 1976; OTSUKA und KONISHI, 1976).

Während ursprünglich angenommen wurde, der ionale Mechanismus der GABA-Wirkung bestehe hauptsächlich in einer Leitfähigkeitserhöhung für Na^+ -Ionen (BARKER und NICOLL, 1972; 1973), mehren sich inzwischen die Belege für eine weitgehende oder ausschließliche Cl^- -Abhängigkeit sowohl der PAD (DAVIDSON und SIMPSON, 1976; OTSUKA und KONISHI, 1976) als auch der depolarisierenden GABA-Wirkung auf Ganglienzellen (NISHI et al., 1974; ADAMS und BROWN, 1975; DESCHENES et al., 1976). Damit scheint sich die ursprüngliche Vermutung von DE GROAT (1972) zu bestätigen, daß GABA der Transmitter der präsynaptischen Hemmung ist und seine Wirkung auf einer Erhöhung der Cl^- -Permeabilität beruht, die aufgrund einer hohen intrazellulären Cl^- -Konzentration eine Depolarisation auslöst.

Eine hohe, nur durch einen zelleinwärts gerichteten Cl^- -Transport aufrechtzuerhaltende intrazelluläre Cl^- -Konzentration wurde schon 1969 von WOODWARD et al. im Ganglion cervicale superior des Kaninchens gemessen (25 mM/l). Das auf dieser Basis errechnete Gleichgewichtspotential für Cl^- (E_{Cl}) liegt deutlich in depolarisierender Richtung (- 40 mV) und stimmt

gut mit den berichteten Gleichgewichtspotentialen der GABA-Wirkung an Ganglien überein (NISHI et al., 1974: - 35 mV; ADAMS und BROWN, 1975: - 40 bis - 50 mV; DESCHENES et al., 1976: - 35 bis - 40 mV).

4.4

Wirkungsmechanismus des Hydrazins

Die oben beschriebenen Wirkungen des Hydrazins auf die postsynaptische Hemmung legen als Wirkungsmechanismus die Blockierung einer (auswärts gerichteten) Cl^- -Pumpe nahe (s.o.). Für einen präsynaptischen Angriffspunkt des Hydrazins, etwa im Sinne einer Beeinträchtigung der Synthese oder der Freisetzung des hemmenden Transmitters, ergab sich kein Anhalt. Der etwas verzögerte Wirkungseintritt erklärt sich daraus, daß Hydrazin die Blut-Hirn-Schranke nur schwer passiert (DAMBRAUSKAS und CORNISH, 1964).

Der von uns beobachtete Effekt des Hydrazins auf die präsynaptische Hemmung in Form einer Verkleinerung von DRP (und PAD) läßt sich durch den gleichen Wirkungsmechanismus erklären, nur beträfe der Block in diesem Fall, an peripheren Neuronen, eine einwärts gerichtete Cl^- -Pumpe. Nach Abschalten des aktiven Cl^- -Transports verteilt sich das Cl^- dem Membranpotential entsprechend passiv über der Membran, das Gleichgewichtspotential E_{Cl} nähert sich zunehmend dem Ruhemembranpotential an: die treibende Kraft für die durch die Cl^- -Leitfähigkeitserhöhung bewirkte Depolarisation (PAD) wird kleiner und mit ihr die PAD (und das DRP). Die Effektivität dieses präsynaptischen Hemmungsmechanismus kann so wirkungsvoll herabgesetzt werden.

Es ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, daß der Wirkungsmechanismus, der für Hydrazin angenommen werden muß, sich grundlegend von dem der meisten anderen bisher untersuchten Krampfgifte unterscheidet. Wenn man etwa die drei "klassischen" Krampfgifte Strychnin, Bicucullin und Tetanus-Toxin betrachtet, so steht jeweils eine Beeinträchtigung der Transmitter-Rezeptor-Wechselwirkung im Vordergrund: Tetanus-Toxin interferiert mit der Freisetzung des hemmenden Überträgerstoffs (BROOKS et al., 1957; CURTIS und JOHNSTON, 1974), Bicucullin scheint ein spezifischer Antagonist des Transmitters der präsynaptischen Hemmung (wahrscheinlich GABA) zu sein (CURTIS et al., 1971; CURTIS und JOHNSTON, 1974; KRNJEVIĆ, 1974) und Strychnin ein Antagonist des Überträgerstoffs der postsynaptischen Hemmung (wahrscheinlich Glycin) (CURTIS, 1962; LARSON, 1969; CURTIS und JOHNSTON, 1974; KRNJEVIĆ, 1974).

Hydrazin jedoch, ähnlich wie Ammonium (LUX et al., 1970; LUX, 1971), hat einen postsynaptischen Wirkungsort: es beeinflusst die ionale Basis der spinalen Hemmungsmechanismen.

5 Zusammenfassung

- 5.1 Die krampferzeugende Wirkung des in den Vitamin-B₆- und GABA-Stoffwechsel eingreifenden Hydrazins wurde an 38 Katzen mit elektrophysiologischen Methoden untersucht.
- 5.2 Bei intravenöser Gabe von Hydrazin (1.0 bis 1.5 mM pro kg KG) zeigte sich nach 20 bis 30 Minuten Krampfaktivität im Elektrocorticogramm und eine deutliche, teilweise reversible Beeinträchtigung sowohl der prä- als auch der postsynaptischen Hemmung im Rückenmark.
- 5.3 Membranpotential (MP) und postsynaptische Erregung (EPSP und AP) blieben bei intrazellulärer Ableitung aus motorischen Vorderhornzellen im wesentlichen ebenso unverändert wie die inhibitorische synaptische Effektivität und die passiven elektrischen Membraneigenschaften (R_N und τ_M).
- 5.4 Die Amplitude des inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) wurde deutlich kleiner und das inhibitorische Gleichgewichtspotential (E_{IPSP}) verlagerte sich von -83.5 ± 5.5 mV ($m \pm S. D.$) auf -71.5 ± 2.5 mV ($n = 17$).
- 5.5 Die intrazelluläre Injektion von Cl^- -Ionen ergab eine Verlängerung der Cl^- -Extrusionszeit um den Faktor 1.8 und eine Vergrößerung der Cl^- -bedingten Verschiebung von E_{IPSP} um den Faktor 1.7 als Ausdruck eines beeinträchtigten transmembranalen Cl^- -Transports.

- 5.6 Die Wirkung auf die präsynaptische Hemmung zeigte sich in einer Amplitudenabnahme des extrazellulär registrierten Hinterwurzelpotentials (DRP) um $16.3 \pm 7\%$ ($n = 5$) und in einer Verminderung der präsynaptischen Hemmbarkeit des Vorderwurzelreflexes (VRR) um 28.6%.
- 5.7 Als disinhibitorischer Wirkungsmechanismus des Hydrazins wird die Blockierung aktiver Cl^- -Transportsysteme zentraler und peripherer Neurone diskutiert unter der Annahme, daß beide Hemmungstypen, die post- und die präsynaptische Hemmung, Cl^- -abhängig sind, und daß für ihre normale Funktion durch aktiven Transport erzeugte transmembranale Cl^- -Konzentrationsgradienten erforderlich sind, die sich nicht im Gleichgewicht mit dem Membranpotential befinden.

- ADAMS, P. R. und D. A. BROWN: Action of γ -aminobutyric acid (GABA) on rat sympathetic ganglion cells. *Br. J. Pharmacol.* 47: 639 - 640 P (1973)
- ADAMS, P. R. und D. A. BROWN: Actions of γ -aminobutyric acid on sympathetic ganglion cells. *J. Physiol. (Lond.)* 250: 85 - 120 (1975)
- AMENTA, J. S. und E. H. JOHNSTON: Hydrazine-induced alterations in rat liver. *Lab. Invest.* 11: 956 - 962 (1962)
- ARAKI, T., M. ITO und O. OSCARSSON: Anion permeability of the synaptic and non-synaptic motoneurone membrane. *J. Physiol. (Lond.)* 159: 410 - 435 (1961)
- BALTHASAR, K.: Morphologie der spinalen Tibialis- und Peroneus-Kerne bei der Katze. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 188: 345 - 378 (1952)
- BALZER, H., P. HOLTZ und D. PALM: Untersuchungen über die biochemischen Grundlagen der konvulsiven Wirkung von Hydraziden. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 239: 520 - 552 (1960)
- BARKER, J. L. und R. A. NICOLL: Gamma-aminobutyric acid: role in primary afferent depolarization. *Science* 176: 1043 - 1045 (1972)
- BARKER, J. L. und R. A. NICOLL: The pharmacology and ionic dependency of amino acid responses in the frog spinal cord. *J. Physiol. (Lond.)* 228: 259 - 277 (1973)

- BARRON, D. H. und B. H. C. MATTHEWS: The interpretation of potential changes in the spinal cord.
J. Physiol. (Lond.) 92: 276 - 321 (1938)
- BAXTER, C. F. und E. ROBERTS: The γ -aminobutyric acid- α -ketoglutaric acid transaminase of beef brain.
J. biol. Chem. 233: 1135 - 1139 (1958)
- BAXTER, C. F. und E. ROBERTS: γ -aminobutyric acid and cerebral metabolism. In: The neurochemistry of nucleotides and amino acids, pp. 127 - 145, Ed. R. O. BRADY und D. B. TOWER.
New York: John Wiley and Sons 1960
- BAXTER, C. F.: The nature of γ -aminobutyric acid. In: Handbook of neurochemistry, Vol. III, pp. 289 - 353, Ed. A. LAJTHA.
New York: Plenum Press 1970
- BAXTER, C. F.: Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation. In: GABA in nervous system function, pp. 61 - 87, Ed. E. ROBERTS, T. N. CHASE und D. B. TOWER.
New York: Raven Press 1976
- BENSON, W. M., P. L. STEFKO und M. D. ROE: Pharmacologic and toxicologic observations on hydrazine derivatives of isonicotinic acid (rimifon, marsilid).
Amer. Rev. Tuberc. 65: 376 - 391 (1952)
- BESSMAN, S. P., J. ROSSEN und E. C. LAYNE: γ -aminobutyric acid transamination in brain.
J. biol. Chem. 201: 385 - 391 (1953)
- BOISTEL, J. und P. FATT: Membrane permeability change during inhibitory transmitter action in crustacean muscle.
J. Physiol. (Lond.) 144: 176 - 191 (1958)

- BOWERY, N. G. und D. A. BROWN: Depolarizing actions of γ -aminobutyric acid and related compounds on rat superior cervical ganglia in vitro.
Br. J. Pharmacol. 50: 205 - 218 (1974)
- BROCK, L. G., J. S. COOMBS und J. C. ECCLES: The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode.
J. Physiol. (Lond.) 117: 431 - 462 (1952)
- BROIHAN, F.: Über die Giftwirkung des Hydrazins.
Zbl. Arbeitsmed. 7: 62 - 66 (1957)
- BROOKS, C. McC., D. R. CURTIS und J. C. ECCLES: The action of tetanus toxin on the inhibition of motoneurons.
J. Physiol. (Lond.) 135: 655 - 672 (1957)
- CLARK, D. A., J. D. BAIRRINGTON, H. L. BITTER, F. L. COE, M. A. MEDINA, J. H. MERRITT und W. N. SCOTT: Pharmacology and toxicology of propellant hydrazines.
Aeromedical Review 11 - 68, 126 pp.
USAF School of Aerospace Medicine, Aerospace Medical Division (AFSC), Brooks AFB, Texas, Dez. 1968
- COOMBS, J. S., J. C. ECCLES und P. FATT: The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory post-synaptic potential.
J. Physiol. (Lond.) 130: 326 - 373 (1955)
- CURTIS, D. R.: The depression of spinal inhibition by electrophoretically administered strychnine.
Int. J. Neuropharmacol. 1: 239 - 250 (1962)

- CUPTIS, D. R., L. HÖSLI, G. A. P. JOHNSTON und I. H. JOHNSTON: The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Exp. Brain Res.* 5: 235 - 258 (1968)
- CUPTIS, D. R., A. M. DUGGAN, D. FELIX und G. A. P. JOHNSTON: Bicuculline, an antagonist of GABA and synaptic inhibition in the spinal cord of the cat. *Brain Res.* 32: 69 - 96 (1971)
- CUPTIS, D. R. und G. A. P. JOHNSTON: Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebn. Physiol.* 69: 97 - 188 (1974)
- DAMBRAUSKAS, T. und H. H. CORNISH: The distribution, metabolism, and excretion of hydrazine in rat and mouse. *Toxicol. appl. Pharmacol.* 6: 653 - 663 (1964)
- DAVIDOFF, P. A.: Gamma-aminobutyric acid antagonism and presynaptic inhibition in the frog spinal cord. *Science* 175: 331 - 333 (1972)
- DAVIDSON, N. und C. A. P. SOUTHWICK: Amino acids and presynaptic inhibition in the rat cuneate nucleus. *J. Physiol. (Lond.)* 219: 689 - 708 (1971)
- DAVIDSON, N. und H. K. L. SIMPSON: Concerning the ionic basis of presynaptic inhibition. *Experientia* 32: 348 - 349 (1976)
- DE GROAT, W. C.: The actions of γ -aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 172: 384 - 396 (1970)

- DE GROAT, W. C.: GABA-depolarization of a sensory ganglion: antagonism by picrotoxin and bicuculline. *Brain Res.* 38: 429 - 432 (1972)
- DE GROAT, W. C., P. M. LALLEY und W. R. SAUM: Depolarization of dorsal root ganglia in the cat by GABA and related amino acids: antagonism by picrotoxin and bicuculline. *Brain Res.* 44: 273 - 277 (1972)
- DEISZ, R. A. und H. D. LUX: Intracellular chloride concentration and postsynaptic inhibition in the crayfish stretch receptor. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 362 (Suppl.): R 28 (1976)
- DEL CASTILLO, J. und B. KATZ: Changes in end-plate activity produced by presynaptic polarization. *J. Physiol. (Lond.)* 124: 586 - 604 (1954)
- DESCHENES, M., P. FELTZ und Y. LAMOUR: A model for an estimate in vivo of the ionic basis of presynaptic inhibition: an intracellular analysis of the GABA-induced depolarization in rat dorsal root ganglia. *Brain Res.* 118: 486 - 493 (1976)
- DESMEDT, J. E. und D. ROBERTSON: Ionic mechanism of the efferent olivo-cochlear inhibition studied by cochlear perfusion in the cat. *J. Physiol. (Lond.)* 241: 407 - 428 (1975)
- ECCLES, J. C., R. M. ECCLES und F. MAGNI: Central inhibitory action attributable to presynaptic depolarization produced by muscle afferent volleys. *J. Physiol. (Lond.)* 159: 147 - 166 (1961)
- ECCLES, J. C., R. SCHMIDT und W. D. WILLIS: Pharmacological studies on presynaptic inhibition.

- ECCLES, J. C., R. M. ECCLES und M. ITO: Effects produced on inhibitory postsynaptic potentials by the coupled injection of cations and anions into motoneurons.
Proc. roy. Soc. B 160: 197 - 210 (1964)
- EIDE, E., I. JURNA und A. LUNDBERG: Conductance measurements from motoneurons during presynaptic inhibition. In: Structure and function of inhibitory neuronal mechanisms, pp. 215 - 219, Ed. C. VON EULER, S. SKOGLUND und U. SÖDERBERG.
Oxford: Pergamon Press 1968
- FELTZ, P. und M. RASMINSKY: A model for the mode of action of GABA on primary afferent terminals: depolarizing effects of GABA applied iontophoretically to neurons of mammalian dorsal root ganglia.
Neuropharmacol. 13: 553 - 563 (1974)
- FINE, E. A., A. M. KUNKEL und J. H. WILLS: Pharmacologic action of hydrazine.
Fed. Proc. 9: 272 (1950)
- FRANK, K. und M. G. F. FUORTES: Stimulation of spinal motoneurons with intracellular electrodes.
J. Physiol. (Lond.) 134: 451 - 470 (1956)
- FRANK, K. und M. G. F. FUORTES: Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes.
Fed. Proc. 16: 39 - 40 (1957)
- FRANK, K.: Basic mechanisms of synaptic transmission in the central nervous system.
IRE Trans. Med. Electr. 6: 85 - 88 (1959)
- GAMMON, G. D., F. W. BURCE und G. KING: Neural toxicity in tuberculous patients treated with isoniazid (isonicotinic acid hydrazide).
Arch. Neurol. Psychiat. 70: 64 - 69 (1953)

GMELIN, G. W.: Effects of electrophoretically applied GABA and bicuculline on presynaptic inhibition in the spinal cord of mammalia.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 362 (Suppl.): R 31 (1976)

GRANIT, R.: The case for presynaptic inhibition by synapses on the terminals of motoneurons. In: Structure and function of inhibitory neuronal mechanisms, pp. 183 - 195, Ed. C. VON EULER, S. SKOGLUND und U. SÖDERBERG.
Oxford: Pergamon Press 1968

HAGIWARA, S. und I. TASAKI: A study on the mechanism of impulse transmission across the giant synapse of the squid.
J. Physiol. (Lond.) 143: 114 - 137 (1958)

HODGKIN, A. L.: The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle.
Biol. Rev. 26: 339 - 409 (1951)

HOLTZ, P. und D. PALM: Pharmacological aspects of vitamin B₆.
Pharmacol. Rev. 16: 113 - 178 (1964)

KELLERTH, J.-O.: Aspects on the relative significance of pre- and postsynaptic inhibition in the spinal cord. In: Structure and function of inhibitory neuronal mechanisms, pp. 197 - 212, Ed. C. VON EULER, S. SKOGLUND und U. SÖDERBERG.
Oxford: Pergamon Press 1968

KRNJEVIĆ, K. und M. E. MORRIS: Extracellular K⁺ activity and slow potential changes in spinal cord and medulla.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 50: 1214 - 1217 (1972)

KRNJEVIĆ, K.: Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates.
Physiol. Rev. 54: 418 - 540 (1974)

KRNJEVIĆ, K.: Inhibitory action of GABA and GABA-mimetics on vertebrate neurons. In: GABA in nervous system function, pp. 269 - 281, Ed. F. FOULSTES, T. N. CHASE und D. B. TOFFER.
New York: Raven Press 1976

KROP, S.: Toxicology of hydrazines: a review.
Arch. industr. Hyg. 9: 199 - 204 (1954)

KUDO, Y., N. ABE, S. GOTO und H. FUKUDA: The chloride-dependent depression by GABA in the frog spinal cord.
Europ. J. Pharmacol. 32: 251 - 259 (1975)

LAJTHA, A., S. BERL und H. WAELSCH: Compartmentalization of glutamic acid metabolism in the central nervous system. In: Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid, pp. 460 - 467, Ed. E. ROBERTS, C. F. BAXTER, A. VAN HARREVELD, C. A. G. WIERSMA, W. R. ADEY und K. F. KILLAM.
Oxford: Pergamon Press 1960

LARSON, M. D.: An analysis of the action of strychnine on the recurrent IPSP and amino acid-induced inhibitions in the cat spinal cord.
Brain Res. 15: 185 - 200 (1969)

LAWSON, S. N., T. J. BISCOE und P. M. HEADLEY: The effect of electrophoretically applied GABA on cultured dissociated spinal cord and sensory ganglion neurones of the rat.
Brain Res. 117: 493 - 497 (1976)

- LETTVIN, J. Y., B. HOWLAND und R. C. GESTELAND: Foot-
notes on a headstage.
IRE Trans. Med. Electr. 10: 26 - 28 (1958)
- LEVY, R. A., A. H. REPKIN und E. G. ANDERSON: The effect
of bicuculline on primary afferent terminal
excitability.
Brain Res. 32: 261 - 265 (1971)
- LEVY, R. A.: GABA: a direct depolarizing action at the
mammalian primary afferent terminal.
Brain Res. 76: 155 - 160 (1974)
- LIEBL, L., H. D. LUX und G. TEN BRUGGENCATE: Potassium
concentration changes during DRP.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 339 (Suppl.):
R 72 (1973)
- LLINAS, R. und R. BAKER: A chloride dependent inhibito-
ry postsynaptic potential in cat trochlear
motoneurons.
J. Neurophysiol. 35: 484 - 492 (1972)
- LLINAS, R., R. BAKER und W. PRECHT: Blockage of inhibi-
tion by ammonium acetate action on chloride
pump in cat trochlear motoneurons.
J. Neurophysiol. 37: 522 - 532 (1974)
- LOEW, O.: Giftwirkung des Diamids.
Ber. dtsh. chem. Ges. 23: 3203 - 3206 (1890)
- LUX, H. D., C. LORACHER und E. NEHER: The action of
ammonium on postsynaptic inhibition of cat
spinal motoneurons.
Exp. Brain Res. 11: 431 - 447 (1970)

- LUX, H. D.: Ammonium and chloride extrusion: hyperpolarizing synaptic inhibition in spinal motoneurons.
Science 173: 555 - 557 (1971)
- LUX, H. D.: Die Wirkung von Ammoniumionen auf den postsynaptischen Hemmungsmechanismus.
Habilitationsschrift, München 1972
- LUX, H. D.: Fast recording ion specific microelectrodes: their use in pharmacological studies in the CNS.
Neuropharmacol. 13: 509 - 517 (1974)
- LUX, H. D. und P. SCHUBERT: Some aspects of the electroanatomy of dendrites. In: Advances in neurology, Vol. 12, pp. 29 - 44, Ed. G. W. KREUTZBERG.
New York: Raven Press 1975
- MACHIYAMA, Y., R. BALÁSZ und T. JULIAN: Oxidation of glucose through the γ -aminobutyrate pathway in brain.
Biochem. J. 96: 68 - 69 P (1965)
- MAYNERT, F. W. und H. K. KAJI: On the relationship of brain GABA to convulsions.
J. Pharmacol. exp. Ther. 137: 114 - 121 (1962)
- MCCORMICK, D. B., B. M. GUIRARD und E. E. SNELL: Comparative inhibition of pyridoxal kinase and glutamic acid decarboxylase by carbonyl reagents.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 104: 554 - 557 (1960)
- MCCORMICK, D. B., M. E. GREGORY und E. E. SNELL: Pyridoxal phosphokinases. I. Assay, distribution, purification, and properties.
J. biol. Chem. 236: 2076 - 2084 (1961)

- McCORMICK, D. B. und E. E. SNELL: Pyridoxal phosphokinases. II. Effects of inhibitors.
J. biol. Chem. 236: 2085 - 2088 (1961)
- McKHANN, G. M., R. W. ALBERS, L. SOKOLOFF, O. MICKELSEN und D. B. TOWER: The quantitative significance of the gamma-aminobutyric acid pathway in cerebral oxidative metabolism. In: Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid, pp. 169 - 181, Ed. E. ROBERTS, C. F. BAXTER, A. VAN HAPREVELD, C. A. G. WIERSMA, W. P. ADEY und K. F. KILLAM.
Oxford: Pergamon Press 1960
- McLAUGHLIN, B. J., R. BARBER, K. SAITO, E. ROBERTS und J. Y. WU: Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat spinal cord.
J. comp. Neurol. 164: 305 - 322 (1975)
- MEDINA, M. A.: The in vivo effects of hydrazines and vitamin B₆ on the metabolism of gamma-aminobutyric acid.
J. Pharmacol. exp. Ther. 140: 133 - 137 (1963)
- MEYER, H. und H. D. LUX: Action of ammonium on a chloride pump. Removal of hyperpolarizing inhibition in an isolated neuron.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 350: 185 - 195 (1974)
- MEYER, H.: The different actions of chloride and potassium on postsynaptic inhibition of an isolated neuron.
J. exp. Biol. 64: 477 - 487 (1976)
- MILEDI, R. und C. R. SLATER: The action of calcium on neuronal synapses in the squid.
J. Physiol. (Lond.) 184: 473 - 498 (1966)

- MIYATA, Y. und M. OTSUKA: Quantitative histochemistry of γ -aminobutyric acid in cat spinal cord with special reference to presynaptic inhibition.
J. Neurochem. 25: 239 - 244 (1975)
- MOTOKIZAWA, F., J. P. REUBEN und H. GRUNDFEST: Ionic permeability of the inhibitory postsynaptic membrane of lobster muscle fibers.
J. gen. Physiol. 54: 437 - 461 (1969)
- NISHI, S., S. MINOTA und A. G. KARCZMAR: Primary afferent neurones: the ionic mechanism of GABA-mediated depolarization.
Neuropharmacol. 13: 215 - 219 (1974)
- OBATA, K.: Transmitter sensitivities of some nerve and muscle cells in culture.
Brain Res. 73: 71 - 88 (1974)
- O'BRIEN, R. D., M. KIRKPATRICK und P. S. MILLER: Poisoning of the rat by hydrazine and alkylhydrazines.
Toxicol. appl. Pharmacol. 6: 371 - 377 (1964)
- OTSUKA, M. und S. KONISHI: GABA in the spinal cord. In: GABA in nervous system function, pp. 197 - 202, Ed. E. ROBERTS, T. N. CHASE und D. B. TOWER.
New York: Raven Press 1976
- OZAWA, S. und K. TSUDA: Membrane permeability change during inhibitory transmitter action in crayfish stretch receptor cell.
J. Neurophysiol. 36: 805 - 816 (1973)
- PATEL, A. J., A. L. JOHNSON und R. BALÁSZ: Metabolic compartmentation of glutamate associated with the formation of γ -aminobutyrate.
J. Neurochem. 23: 1271 - 1279 (1974)

- RICHARDS, C. D. und A. C. WEBB: The effect of nitrous oxide on cats anaesthetized with Brietal.
J. Physiol. (Lond.) 245: 72 - 73 P (1975)
- ROBERTS, E. und S. FRANKEL: Glutamic acid decarboxylase in brain.
J. biol. Chem. 188: 789 - 795 (1951)
- ROBERTS, E. und H. M. BREGOFF: Transamination of γ -aminobutyric acid and β -alanine in brain and liver.
J. biol. Chem. 201: 393 - 398 (1953)
- ROBERTS, E.: Formation and utilization of γ -aminobutyric acid in brain. In: Progress in Neurobiology I, Neurochemistry, pp. 11 - 25, Ed. S. R. KOREY und J. I. NURNBERGER.
London: Cassell and Company 1956
- ROBERTS, E., C. F. BAXTER, A. VAN HARREVELD, C. A. G. WIERSMA, W. R. ADEY und K. F. KILLAM (Eds.): Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid.
Oxford: Pergamon Press 1960
- ROBERTS, E., J. WEIN und D. G. SIMONSEN: γ -ABA, vitamin B₆ and neuronal function - a speculative synthesis.
Vit. and Horm. 22: 503 - 559 (1964)
- ROBERTS, E. und R. HAMPEPSCHLAG: Amino acid transmitters. In: Basic neurochemistry, 2nd Ed., pp. 218 - 245, Ed. G. J. SIEGEL, R. W. ALBERS, P. KATZMAN und B. W. AGRANOFF.
Boston: Little, Brown and Company 1976
- RÖMPP, H.: Chemie-Lexikon, Vol. II, pp. 2818 - 2822.
Stuttgart: Franckh'sche Verlagshandlung 1966

- ROMANES, G. J.: The motor cell columns of the lumbosacral spinal cord of the cat.
J. comp. Neurol. 94: 313 - 364 (1951)
- RUSSEL, W. J.: Nitrous oxide - is it an adequate anaesthetic?
J. Physiol. (Lond.) 231: 20 - 21 P (1973)
- SAUBERLICH, H. E.: Biochemical systems and biochemical detection of deficiency. In: The vitamins, Vol. 2, 2nd Ed., pp. 44 - 80, Ed. W. H. SEBRELL, Jr. und R. S. HARRIS.
New York: Academic Press 1968
- SCHMIDT, R. F.: Presynaptic inhibition in the vertebrate central nervous system.
Ergebn. Physiol. 63: 20 - 101 (1971)
- TAKEUCHI, A. und N. TAKEUCHI: Electrical changes in pre- and post-synaptic axons of the giant synapse of Loligo.
J. gen. Physiol. 45: 1181 - 1193 (1962)
- TAKEUCHI, A. und N. TAKEUCHI: Anion permeability of the inhibitory post-synaptic membrane of the crayfish neuromuscular junction.
J. Physiol. (Lond.) 191: 575 - 590 (1967)
- TAKEUCHI, A.: Studies of inhibitory effects of GABA in invertebrate nervous systems. In: GABA in nervous system function, pp. 255 - 267, Ed. E. FOJLITS, T. N. CHASE und D. P. TOWER.
New York: Raven Press 1976
- TAPIA, R., M.-E. SANDOVAL und P. CONTREPAS: Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability.
J. Neurochem. 24: 1283 - 1285 (1975)

- TEN BRUGGENCE, C., H. D. LUX und L. LIEBL: Possible relationships between extracellular potassium activity and presynaptic inhibition in the spinal cord of the cat.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 349: 301 - 317 (1974)
- TOWER, D. B.: Neurochemical aspects of pyridoxine metabolism und function.
Amer. J. clin. Nutr. 4: 329 - 345 (1956)
- TOWER, D. B.: Neurochemistry of epilepsy.
Springfield: Charles C. Thomas 1960
- TOWER, D. B.: Neurochemical mechanisms. In: Basic mechanisms of the epilepsies, pp. 611 - 638, Ed. H. H. JASPER, A. A. WARD, Jr. und A. POPE.
Boston: Little, Brown and Company 1969
- TRENDELENBURG, P.: Ammoniakderivate (Hydroxylamin, Hydrazin), aliphatische Amine und Amide, Aminosäuren. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol. I, pp. 504 - 563, Ed. A. HEFFTER.
Berlin: Julius Springer 1923
- UCHIDA, T. und R. D. O'BRIEN: The effects of hydrazines on rat brain 5-hydroxytryptamine, norepinephrine, and gamma-aminobutyric acid.
Biochem. Pharmacol. 13: 725 - 730 (1964)
- VYKlický, L., E. SYKOVÁ, N. KřÍŽ und E. UJEC: Post-stimulation changes of extracellular potassium concentration in the spinal cord of the rat.
Brain. Res. 45: 608 - 611 (1972)
- VYKlický, L., E. SYKOVÁ und B. MELLEROVÁ: Denolarization of primary afferents in the frog spinal cord under high Mg^{2+} concentrations.
Brain Res. 117: 153 - 156 (1976)

- WEINER, W. J. und H. L. KLAWANS: Vitamin B₆. In: Hand-
book of clinical neurology, Vol. 28, Metabo-
lic and deficiency diseases in the nervous
system, Part II, pp. 105 - 139, Ed. P. J.
VINKEN, G. W. BRUYN und H. L. KLAWANS.
Amsterdam: North Holland Publishing Company
1976
- WEIR, F. W., J. H. NEMENZO, S. BENNETT und F. H. MEYERS:
A study of the mechanism of acute toxic effects
of hydrazine, UDMH, MMH, and SDMH.
AMRL-TDR-64-26
Biomedical Laboratory, Aerospace Medical
Research Laboratories, Aerospace Medical Division
AFSC, Wright-Patterson AFB, Ohio 1964
- WITKIN, L. B.: Acute toxicity of hydrazine and some of
its methylated derivatives.
Arch. industr. Hyg. 13: 34 - 36 (1956)
- WOOD, J. D. und S. J. PEESKER: Development of an expression
which relates the excitable state of the brain
to the level of GAD activity and GABA content,
with particular reference to the action of hydra-
zine and its derivatives.
J. Neurochem. 23: 703 - 712 (1974)
- WOOD, J. D. und S. J. PEESKER: The anticonvulsant action
of GABA-elevating agents: a re-evaluation.
J. Neurochem. 25: 277 - 282 (1975)
- WOOD, J. C., R. J. McLAUGHLIN und J. E. VAUGHN: Immuno-
cytochemical localization of GAD in electron
microscopic preparations of rodent CNS. In:
GABA in nervous system function, pp. 133 - 148,
Ed. E. ROBERTS, T. N. CHASE und D. B. TOWER.
New York: Raven Press 1976

- WOODWARD, J. K., C. P. BIANCHI und S. D. ERULKAR:
Electrolyte distribution in rabbit superior
cervical ganglion.
J. Neurochem. 16: 289 - 299 (1969)
- WU, J.-Y. und E. ROBERTS: Properties of brain L-gluta-
mate decarboxylase: inhibition studies.
J. Neurochem. 23: 759 -767 (1974)
- WU, J.-Y.: Purification, characterization, and kinetic
studies of GAD and GABA-T from mouse brain.
In: GABA in nervous system function, pp. 7 - 55,
Ed. E. ROBERTS, T. N. CHASE und D. B. TOWER.
New York: Raven Press 1976

Lebenslauf:

25. 04. 47 In Ingolstadt als Sohn des Facharztes für Chirurgie Dr. med. Ludwig Liebl und seiner Ehefrau Agnes, geb. Sonnen. geboren.
19. 07. 66 Abitur am Reuchlin-Gymnasium in Ingolstadt. Anschließend Beginn des Medizinstudiums an der Universität München.
14. 06. 72 Ärztliche Prüfung mit der Note "sehr gut" bestanden. Anschließend Tätigkeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abt. Neurophysiologie, als Stipendiat der Max-Planck-Gesellschaft mit experimenteller Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Medizinalassistentenzeit an der I. Medizinischen Klinik der Universität, München, und am Kreiskrankenhaus in Mering.
01. 11. 74 Wissenschaftlicher Assistent am MPI für Psychiatrie.
11. 11. 74 Erteilung der Approbation.
07. 04. 75 bis 30. 06. 76 Ableistung des Grundwehrdienstes.

